

UNIVERZITA KARLOVA
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA
ÚSTAV FYZIOLOGIE



ÚLOHA iNOS A ŽÍRNÝCH BUNĚK V MECHANISMU ROZVOJE
HYPOXICKÉ PLICNÍ HYPERTENZE

DIZERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Alena Baňasová
Praha 2008

Srdečně děkuji mému školiteli prof. RNDr. Václavu Hamplovi, DrSc., rektoru Univerzity Karlovy v Praze a prof. MUDr. Janu Hergetovi, DrSc. za podporu, pomoc a trpělivost, v průběhu mého postgraduálního studiu a při sepisování této práce. Svým rodičům a blízkým děkuji za toleranci a podporu díky které jsem mohla tuto práci dokončit. Evženu Beitlovi děkuji za jazykovou korekturu textu.

1.	<u>ÚVOD</u>	
1.1.	Funkční morfologie zdravého plicního řečiště	7
1.2.	Hypoxická plicní hypertenze (HPH)	8
1.2.1.	Patogeneze hypoxické plicní hypertenze	9
1.2.1.1.	Oxidační poškození stěny periferních plicních cév	10
1.2.1.2. A)	Zvýšení metabolismu vláken pojivové matrix stěny periferních plicních cév	11
1.2.1.2. B)	Stimulace proliferace mesenchymových buněk periferních plicních cév	13
1.2.1.3.	Fibrotizace, muskularizace, hypertrofie stěny periferních plicních cév	13
1.2.1.4.	Důležité jsou změny v počáteční fázi expozice hypoxií	14
1.3.	Oxid dusnatý (NO)	15
1.3.1.	Biosyntéza NO	16
1.3.2.	Reakce NO s radikály	17
1.3.3.	Produkce NO v plicní cirkulaci a jeho úloha v regulaci tonu plicních cév	18
1.3.4.	Úloha NO při vzniku HPH	19
1.3.5.	Úloha iNOS v patogenezi HPH	22
1.4.	Žírné buňky a jejich úloha v rozvoji HPH	23
2.	<u>CÍLE POKUSŮ</u>	27
3.	<u>METODIKY</u>	30
3.1.	<u>Laboratorní zvířata</u>	30
3.2.	<u>Anestézie</u>	30
3.3.	<u>Indukce a hodnocení vzniku hypoxické plicní hypertenze</u>	31
3.4.	<u>Použité techniky</u>	31
3.4.1.	Izobarická hypoxická komora	31
3.4.2.	Měření koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu	32
3.4.3.	Hemodynamická vyšetření	34
3.4.3.1.	Katetrizace plicnice	34

3.4.3.2.	Měření minutového srdečního výdeje.....	35
3.4.3.3.	Měření systémového středního arteriálního tlaku.....	35
3.5.	<u>Kvantitativní morfologická vyšetření.....</u>	36
3.5.1.	Analýza váhy jednotlivých srdečních oddílů.....	36
3.5.2.	Histologické vyšetření.....	36
3.6.	<u>Statistické zpracování výsledků.....</u>	37

4. **PROTOKOLY JEDNOTLIVÝCH POKUSŮ A VÝSLEDKY**

4.1.	Indukce iNOS iniciuje rozvoj hypoxické plicní hypertenze.....	38
4.1.1.	Stanovení dávky L-NIL pro dlouhodobé perorální podávání.....	38
4.1.2	Inhibice NOS v průběhu jednotýdenní hypoxické expozice.....	42
4.1.3.	Inhibice NOS v průběhu prvního týdne 3-týdenní hypoxické expozice.....	48
4.1.4.	Inhibice NOS v průběhu posledních 10 dnů 3-týdenní hypoxické expozice.....	54
4.1.5.	Expres iNOS v plicních cévách na začátku chronické hypoxické expozice.....	58
4.1.6.	Změny koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu v průběhu expozice chronické hypoxii.....	59
4.1.7.	Koncentrace nitrotyrosinu v plicní tkáni po 4. dni hypoxické expozice	62
4.2.	Inhibice degranulace žírných buněk na začátku expozice chronické hypoxii	63

5. **DISKUZE**

5.1.	Indukce iNOS se podílí na rozvoji HPH.....	70
5.2.	Inhibice degranulace žírných buněk na začátku expozice chronické hypoxii tlumí rozvoj PH.....	77
5.3.	Obecná diskuze závěrů	81

6.	<u>ZÁVĚRY</u>	86
7.	<u>POUŽITÁ LITERATURA</u>	87
8.	<u>VLASTNÍ PUBLIKACE AUTORA</u>	
9.	<u>PŘÍLOHY</u>	

SEZNAM ZKRATEK POUŽITÝCH V TEXTU

B W	body weight - tělesná hmotnost
Ca₂OH	hydroxid vápenatý
CI	cardiac index - srdeční index
CO	cardiac output - srdeční výdej
CO₂	oxid uhličitý
DSCG	kromoglykát sodný
FiO₂	frakce kyslíku
HPH	hypoxická plicní hypertenze
HPV	hypoxická plicní vazokonstrikce
KOH	hydroxid vápenatý
L-NAME	N ^G - nitro – L - arginine methyl ester
L-NIL	L-N6-(1-iminoethyl) lysin
L-NMMA	N ^G -monometyl-L-arginin
LPS	lipolysacharid, endotoxin
LV+S	hmotnost levé srdeční komory se septem
MMP	matrix-metaloproteináza
NaOH	hydroxid sodný
NO	oxid dusnatý
NOS	NO syntáza
eNOS	endotelilální NO syntáza
iNOS	inducibilní NO syntáza
nNOS	neuronální NO syntáza
PAP	tlak v a. pulmonalis
PH	plicní hypertenze
PVR	plicní vaskulární rezistence
ROS	reactive oxygen species-reaktivní sloučeniny kyslíku
RV	hmotnost pravé srdeční komory
SAP	systemový střední arteriální tlak
TIMP	tkáňové inhibitory metaloproteináz
5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin
5-HTT	transportní molekula 5-hydroxytryptaminu

1. ÚVOD

1.1. Funkční morfologie zdravého plicního řečiště

Normální plicní cirkulace funguje jako nízkotlaký systém s vysokým průtokem a nízkým periferním cévním odporem (Heath 1977; Janicki, Weber et al. 1985). Příčinami nízkého odporu plicních cév jsou struktura jejich stěny a velmi nízký bazální tonus hladkého svalů (Heath 1977; Hislop and Reid 1978). Plicní cévy jsou mnohem poddajnější než cévy systémového řečiště a mají tenčí stěnu. U zdravého člověka, žijícího v normoxii, se hladký sval ve stěně periferních plicních cév vyskytuje sporadicky (Hislop and Reid 1978).

Zatímco jednotlivá orgánová řečiště systémového oběhu přijímají pouze část srdečního výdeje, malým oběhem protéká za všech podmínek srdeční výdej celý. Plicní řečiště má schopnost pojmout i značně zvýšený srdeční výdej jen s minimálním zvýšením tlaku. Toto je možné díky velké poddajnosti plicních cév a díky otevření částí cévního řečiště, které nejsou v klidu perfundovány díky vyššímu otevíracímu tlaku.

Distribuce průtoku krve jednotlivými oblastmi plic je regulována téměř výhradně lokálními mechanismy. Smyslem této regulace je udržet efektivní výměnu plynů a zajistit maximální nasycení krve kyslíkem. Proto jsou přednostně perfundovány dobře ventilované alveoly a zároveň je omezen průtok tam, kde je alveolární ventilace nedokonalá. Mechanismem, který udržuje optimální poměr mezi ventilací a perfúzí alveolů, je vazokonstrikce vyvolaná lokálním působením hypoxie - hypoxická plicní vazokonstrikce (HPV)

(Weir and Archer 1995). HPV byla Eulerem a Liljestrandem popsána již v polovině minulého století (Von Euler and Liljestrand 1946). HPV je typická pro plicní cévy a odlišuje je od cév systémových. V orgánech zásobených systémovou cirkulací totiž hypoxie periferní cévní odpor buď příliš nemění, anebo působí vazodilataci (Yuan, Tod et al. 1990).

1.2. Hypoxická plicní hypertenze (HPH)

Plicní hypertenze (PH) je syndrom charakterizovaný chronickým zvýšením tlaku v plicnici (PAP), zvýšením plicního cévního odporu (PVR) nebo kombinací obou těchto parametrů (Weir 1984). Dále je pro PH charakteristické ztlustění plicních artérií a hypertrofie pravé komory srdeční (Abraham, Kay et al. 1971; Hislop and Reid 1977; Rabinovitch, Gamble et al. 1979).

PH je ve většině případů sekundárním důsledkem jiných plicních či kardiálních nemocí, které pak dále závažně komplikuje. Primární PH je velmi závažné a naštěstí vzácné onemocnění.

Významným podnětem pro vznik PH je chronická alveolární hypoxie. Nejčastější příčinou alveolární hypoxie jsou primární onemocnění plicního parenchymu (např. chronická obstrukční plicní nemoc, plicní fibroza, bronchiektázie, TBC) (Widimsky 1976). Chronická alveolární hypoxie je typická pro obyvatele vysoké nadmořské výšky a je přítomna též u pacientů s deformitami hrudní stěny a u pacientů se syndromem spánkové apnoe. Chronickou hypoxií vyvolaná PH se pak označuje jako hypoxická plicní hypertenze. HPH vyvolaná dlouhodobým vystavením laboratorních

zvířat atmosféře s nízkým obsahem kyslíku je nejčastějším přístupem umožňujícím studovat patofysiologické mechanismy vzniku tohoto onemocnění (Herget and Paleček 1975).

1.2.1. Patogeneze HPH

HPH se rozvíjí na podkladě vazokonstrikce (Crossno, Garat et al. 2007; Oka, Homma et al. 2007) a remodelace periferních plicních cév při chronickém působení hypoxie (Reid 1986). Původně se předpokládalo, že vyšší tonus plicních cév hraje roli hlavně v počáteční fázi expozice chronické hypoxii (na začátku rozvoje HPH), protože ve fázi rozvinuté HPH nelze odpor výrazněji snížit podáním vazodilatancií. Tuto představu recentně opravili McMurthy a kol., když ukázali, že inhibitory Rho-kinázového systému dramaticky sníží PVR u již rozvinuté HPH (Stenmark and McMurtry 2005).

Řada údajů ukazuje, že na remodelaci cévní stěny lze pohlížet jako na reakci na její hypoxické poškození. Je to komplexní proces, charakterizovaný změnami pojivové matrix cévní stěny ve smyslu zmnožení jejích pojivových složek a proliferací mezenchymálních buněk (Reid 1986). Výsledkem těchto dějů jsou fibróza a muskularizace periferních plicních cév (Herget and Ježek 1989). Obojí zužuje průsvit cév a snižuje poddajnost cévní stěny a tím zvyšuje periferní plicní odpor. Konečným důsledkem je vzestup plicního arteriálního tlaku.

Údaje o jednotlivých procesech podílejících se na vzniku HPH jsou nekompletní. Na základě dosavadních poznatků z našeho a z jiných pracovišť

se domníváme, že chronická hypoxie způsobuje HPH následujícím mechanismem (obr. 1).

1.2.1.1. Oxidační poškození stěny periferních plicních cév

Stimulem pro zahájení strukturální přestavby prealveolárních plicních cév je oxidační poškození jejich stěny. Za toto poškození odpovídají volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species - ROS). V současné době existuje již dostatečné množství důkazů o tom, že expozice hypoxii je spojená s oxidačním stresem plicní tkáně (Block, Patel et al. 1989; Chang, Stelzner et al. 1989; Hoshikawa, Ono et al. 1995; Nakanishi, Tajima et al. 1995; Hoshikawa, Ono et al. 2001). ROS jsou při chronické hypoxii produkovány zejména aktivovanými alveolárními makrofágy (DiGregorio, Cilento et al. 1987; Shellito, Sniezek et al. 1987). Ty se při vystavení chronické hypoxii v plicích zmnožují (Richards, Smith et al. 1980) a hypoxie usnadňuje jejich aktivaci a schopnost produkovat H_2O_2 (Wilhelm, Sojková et al. 1996).

Hypoxií indukované uvolnění volných radikálů a následné oxidativní poškození cévní stěny podle naší hypotézy stimuluje metabolismus pojivových proteinů matrix cévní stěny a v konečném důsledku nárůst jejich produkce a rovněž stimuluje proliferaci mezenchymálních buněk. Stimulací proteolýzy a proliferace mezenchymálních elementů je zahájen proces vaskulární remodelace periferních plicních cév.

Význam ROS pro vznik HPH ukazují studie, v nichž inhibice produkce ROS redukuje rozvoj HPH (Nakanishi, Tajima et al. 1995; Lachmanová, Hnilickova et al. 2005).

1.2.1.2. A) Zvýšení metabolismu vláken pojivové matrix stěny periferních plicních cév

Při chronické hypoxii se pravděpodobně radikálovým tkáňovým poškozením aktivuje metabolismus pojivových proteinů. Celá řada autorů prokázala, že se při rozvoji hypoxické plicní hypertenze ve stěně periferních plicních cév zvyšuje metabolický obrat kolagenu (Kerr, Ruppert et al. 1987; Bishop, Guerreiro et al. 1990; Botney, Liptay et al. 1993). Klíčové postavení v metabolismu kolagenu zastávají specifické matrix-metaloproteinázy (MMP), přičemž výsadní pozici má intersticiální kolagenáza MMP-13. Ta je jediným enzymem schopným zahájit štěpení rezistentní molekuly kolagenu typu I. MMP-13 štěpí kolagen typu I na 1/4 a 3/4 fragmenty (Knäuper, López-Otin et al. 1996). Teprve takto vzniklé štěpy kolagenu mohou být dále rozkládány řadou dalších již nesespecifických proteáz. V periferních plicních cévách zvířat vystavených chronické hypoxii byla prokázána jak přímo zvýšená kolagenolytická aktivita (Novotna and Herget 1998; Novotna, Bibova et al. 2001; Novotna and Herget 2002), tak i přítomnost nízkomolekulárních štěpů této velikosti (Novotná and Herget 1998; Novotna, Bibova et al. 2001). Rabinovitch prokázala kauzální roli elastolytické aktivity při vzniku vaskulárních změn spojených s rozvojem hypoxické plicní hypertenze (Rabinovitch 1999).

Za fyziologických okolností jsou metaloproteinázy produkovány ve formě neaktivního proenzymu nebo jsou účinně inhibovány tkáňovými inhibitory (TIMP). Poškození extracelulární matrix stěn periferních plicních cév nebo oxidace aktivního místa metaloproteináz radikálovými produkty jsou možnými příčinami aktivace metaloproteináz. V pokusech in vitro bylo prokázáno, že takto mohou působit superoxid, peroxid vodíku, oxid dusnatý (NO) i peroxynitrit (produkt rychlé reakce superoxidu a NO) (Rajagopalan, Meng et al. 1996). Navíc peroxynitrit a zřejmě i jiné radikály jsou schopné inaktivovat tkáňové inhibitory metaloproteináz jejich fragmentací (Rathke-Hartlieb, Budde et al. 2000). Podávání antioxidantů během prvních dnů hypoxické expozice aktivaci metaloproteináz účinně brání (Maxova, Novotna et al. 2004) a zároveň podstatně omezuje rozvoj plicní hypertenze (Hoshikawa, Ono et al. 1995; Lachmanova, Hnilickova et al. 2005). Aktivace MMP zahajuje kaskádu, v níž akumulace štěpů kolagenu (Novotná and Herget 1998) stimuluje syntézu nových kolagenních molekul (Gardi, Pacini et al. 1990; Gardi, Calzoni et al. 1994) a celkový metabolický obrat kolagenu tak roste (Bishop, Guerreiro et al. 1990).

Metaloproteinázy mohou být v poškozené tkáni plicních cév produkovány prakticky všemi mezenchymovými buňkami. Jejich důležitým zdrojem jsou žírné buňky. Ty v časných fázích hypoxie proliferují a jejich množství se významně zvyšuje právě v okolí periferních plicních cév (Vajner, Vytasek et al. 2006).

Klíčovou úlohu aktivace metaloproteináz v mechanismu HPH ukazuje naše studie, v níž farmakologická inhibice metaloproteináz zmírnila plicní hypertenzi u chronicky hypoxických potkanů (Herget, Novotna et al. 2003).

1.2.1.2. B) Stimulace proliferace mezenchymových buněk periferních plicních cév

Zvýšená kolagenolytická aktivita s následnou kumulací štěpů pojivových bílkovin je významným stimulem proliferace mezenchymových buněk ve stěně periferních plicních cév (Herget, Wilhelm et al. 2000). Mezenchymové buňky jsou udržovány v klidovém stavu tím, že adherují k pojivové matrix. Změna kvality pojivové matrix (oxidace, fragmentace) snižuje adhezi mezenchymových buněk. Bačáková a kol. prokázali, že zvýšená produkce ROS může působit oxidační změny pojivových proteinů matrix cévní stěny (Bacakova, Wilhelm et al. 1997). Dále prokázali, že oxidace kolagenu in vitro mění expresi adhesivních molekul hladkého svalu (Bacakova, Wilhelm et al. 1997). Navíc pak bylo prokázáno, že oxidovaný kolagen stimuluje proliferaci hladkých svalových buněk plicních cév více než kolagen neoxidovaný (Bacakova, Wilhelm et al. 1997). Oxidace pojiva následně zvyšuje jeho citlivost k proteolýze (Monboisse, Gardes-Albert et al. 1988). Nízkomolekulární kolagenní fragmenty mají proproliferální efekt.

1.2.1.3. Fibrotizace, muskularizace, hypertrofie stěny periferních plicních cév

Akumulace kolagenních fibril způsobuje fibrózu cévní stěny, která postihuje médii i adventicii (Bishop, Guerreiro et al. 1990). Buňky hladkého svalů hypertrofují a prolifерují do oblasti prealveolárních plicních cév (Reid

1986). Jak již bylo zmíněno, zatímco za fyziologických podmínek jsou v periferních plicních cévách přítomna jen ojedinělá svalová vlákna (Hislop and Reid 1978), při plicní hypertenzi je jejich média tvořena souvislým prstencem hladkého svalu. Charakteristickým morfoloogickým obrazem HPH jsou pak zúžené periferní plicní cévy s výraznou a jasně definovanou médií, ohraničenou dvěma elastickými vrstvami, a s fibrózou adventicie.

1.2.1.4. Důležité jsou změny v počáteční fázi expozice hypoxii

Při rozvoji HPH probíhají rozhodující procesy pravděpodobně v počátcích expozice chronické hypoxii (přibližně v 1. týdnu). V dalším průběhu hypoxické expozice již v plicním řečišti zřejmě nedochází ke vzniku významných funkčních a morfoloogických změn, které by se zásadním způsobem podíleli na progresi HPH.

U potkanů vystavených hypoxii (10% O₂) se HPH rozvíjí v průběhu prvních dvou týdnů této expozice, poté se stabilizuje a dále již neprogreduje (Herget, Suggett et al. 1978). Zvýšený tlak v plicnici, hypertrofie pravého srdce i muskularizace prealveolárních cév byly rovněž zaregistrovány již po prvním týdnu hypoxické expozice (Rabinovitch, Gamble et al. 1981). Předpokládáme, že radikálové poškození stěny plicních cév, které je klíčovým faktorem v rozvoji HPH, vzniká právě v prvních hodinách a dnech působení hypoxie. Ukázali jsme, že tvorba kyslíkových radikálů v plicích rychle stoupá právě na začátku hypoxické expozice a pak nejenom dále neroste, ale spíše klesá (Johnson, Hodyc et al. 2007). Wilhelm a spol.potvrdili, že produkce peroxidu vodíku

alveolárními makrofágy, izolovanými z plic potkanů na začátku expozice hypoxií (po třech dnech hypoxie), je signifikantně vyšší nejenom než produkce makrofágy získanými z normoxických kontrol, ale také než produkce alveolárními makrofágy získanými z potkanů vystavených hypoxii po tři týdny (Wilhelm, Sojková et al. 1996). Hypotézu o významném radikálovém působení na začátku rozvoje HPH podporuje i další studie naší skupiny, která prokázala, že podávání antioxidantu (N-acetyl-L-cysteinu) pouze v časných fázích hypoxické expozice zbrzdilo rozvoj plicní hypertenze podstatně více než jeho podávání až v pozdější stabilizované fázi HPH (Lachmanova, Hnilickova et al. 2005).

1. 3. Oxid dusnatý (NO)

Jedním z radikálů, které se mohou účastnit mechanismu rozvoje HPH je NO. NO je znám především jako endogenní vazodilatační molekula (Furchgott and Zawadzki 1980). Kromě regulace cévního tonu se účastní též mnoha dalších důležitých fyziologických a patofyziologických procesů, zahrnujících např. modulaci zánětlivé odpovědi, neurotransmisi, hormonální sekreci či apoptózu (Furchgott and Zawadzki 1980; Ignarro, Buga et al. 1987; Palmer, Ferrige et al. 1987; Moncada, Palmer et al. 1991; Moncada and Higgs 1993; Moncada and Martin 1993; Bredt and Snyder 1994). Významnou roli hraje v imunitních procesech (Clancy, Amin et al. 1998). NO rovněž inhibuje adhezi a agregaci trombocytů, tlumí aktivitu leukocytů a má antiproliferativní účinky (Moncada 1994).

1.3.1. Biosyntéza NO

NO vzniká oxidací aminokyseliny L- argininu za vzniku L-citrulinu (Furchgott and Zawadzki 1980; Palmer, Rees et al. 1988; Moncada, Palmer et al. 1989; Palmer and Moncada 1989; Leone, Palmer et al. 1991; Moncada, Palmer et al. 1991). Reakci katalyzuje enzym NO syntáza (NOS)(Palmer and Moncada 1989; Leone, Palmer et al. 1991; Knowles 1996; Knowles 1997; Stuehr 1997). V současnosti jsou detailně charakterizovány tři izoformy NO syntázy: neuronální (nNOS), indukibilní (iNOS) a endoteliální (eNOS). V literatuře se můžeme setkat i s jinou klasifikací (NOS I, NOS II, NOS III). V této práci používáme rozlišení pomocí písmen.

Podstatně méně jasnou oblastí jsou NOS izoformy v mitochondriích (Ghafourifar and Richter 1997; Giulivi, Poderoso et al. 1998). Z hlediska této práce však nejsou podstatné.

Třebaže konstitutivně exprimované izoformy (nNOS, eNOS) byly poprvé popsány v neuronech a endoteliích, jsou přítomny i v mnoha jiných buněčných typech (Moncada and Higgs 1993). Jejich aktivita je regulována hladinou vápníku a kalmodulinu (Knowles and Moncada 1994; Nathan and Xie 1994). V bazálních podmínkách nNOS a eNOS uvolňují relativně malé množství NO v odpovědi na podněty různých agonistů, jakými jsou např. acetylcholin v cévním endotelu, glutamát v mozkové tkáni nebo kolagén aktivující trombocyty. NO produkovaný těmito subtypy NOS plní roli signální molekuly. Inducibilní izoforma (iNOS) je kalcium a kalmodulin-independentní. Je exprimována makrofágy a jinými buňkami (např. chondrocyty, neutrofilů, hepatocyty a hladkými svalovými buňkami) (Gaston, Drazen et al. 1994) po

stimulaci zánětlivými cytokiny (IL-1, TNF, IFN- γ) a lipopolysacharidem bakteriální stěny (LPS, endotoxin). V tomto případě inducibilní enzym vytváří signifikantně větší množství NO než produkují konstitutivní izoformy. Takto produkováný NO působí jako cytotoxická molekula v boji proti invadujícím mikroorganismům a nádorovým buňkám (Hickey, Sharkey et al. 1997; Clancy, Amin et al. 1998). LPS výrazně zvyšuje expresi iNOS v plicní tkáni (Knowles, Merrett et al. 1990; Kleschyov, Muller et al. 1998). iNOS mRNA byla detekována in vivo v plicích po podání LPS (Griffiths, Liu et al. 1995). Indukce iNOS mRNA a nárůst produkce NO byly rovněž pozorovány in vitro po stimulaci cytokiny a LPS a to jak v endoteliích (Geiger, Stone et al. 1997), tak i v hladkých svalových buňkách a. pulmonalis (Nakayama, Geller et al. 1992).

1.3.2. Reakce NO s radikály

NO je nestabilní radikál s jedním nepárovým elektronem. Z patofyziologického hlediska je významná extrémně rychlá reakce NO se superoxidem ($O_2^{\cdot -}$), při které vzniká toxický peroxynitrit (OONO-) (Butler, Flitney et al. 1995; Vinten-Johansen 2000). Toxicita peroxynitritu spočívá v oxidaci SH-skupin bílkovin, atomů železa a síry v biologických molekulách a v peroxidaci lipidů. Může rovněž indukovat poškození DNA a apoptózu (Patel, McAndrew et al. 1999).

1.3.3. Produkce NO v plicní cirkulaci a jeho úloha v regulaci tonu plicních cév

V cévách velkého oběhu je NO trvale produkován a významně se podílí na udržování klidového tonu (Rees, Palmer et al. 1989; Gardiner, Compton et al. 1990). Tonicky významná syntéza NO ve zdravé plicní cirkulaci však přítomná není. Malé prekapilární plicní tepny a tepénky jsou jedinými cévami schopnými podstatnější vazokonstrikce. Jsou označovány též jako cévy odporové a jsou rozhodující pro regulaci plicní hemodynamiky. NO syntéza a její mRNA v nich lokalizovány nebyly (Xue, Rengasamy et al. 1994; Kawai, Bloch et al. 1995; Shaul, North et al. 1995; Le Cras, Xue et al. 1996; Xue and Johns 1996; Carville, Adnot et al. 1997; Tyler, Muramatsu et al. 1999). Při měření produkce NO a jeho oxidačních produktů (NO je v přítomnosti kyslíku velmi rychle oxidován) v perfuzátu izolovaných plic zdravého potkana nebyly detekovány koncentrace, které by bylo možné měřit buď pomocí velmi citlivé chemilunescenční metody (Isaacson, Hampl et al. 1994). Inhibice syntézy NO v preparátech izolovaných plic neměla vliv na bazální cévní tonus (Archer, Tolins et al. 1989; Hasunuma, Yamaguchi et al. 1991). Při studiích prováděných in vivo vyvolala inhibice tvorby NO u laboratorních zvířat zvýšení systémového tlaku a zároveň pokles srdečního výdeje, ale neměla vliv na velikost tlaku v plicnici (Isaacson, Hampl et al. 1994). Rovněž dlouhodobá inhibice syntézy NO potvrdila, že v plicní cirkulaci neexistuje funkčně významná bazální syntéza NO. Chronické podávání inhibitorů NOS působí vznik systémové hypertenze, tlak v plicnici se ale chronickou inhibicí NOS nezvyšuje (Hampl, Archer et al. 1993). Ve zdravém plicním řečišti je tedy klidová produkce NO minimální a

nepřispívá k udržování plicního cévního tonu na nízké hodnotě. Situace se však mění při akutně vzniklé hypoxii, kdy produkce NO v plicním řečišti významně stoupá. Hypoxie stimuluje expresi NOS v plicích potkanů (Gess, Schricker et al. 1997). V kultuře hovězích endoteliálních plicních buněk byl prokázán nárůst produkce NO i jeho oxidačních produktů při akutně vyvolané hypoxii. Inhibice NO syntázy v preparátu izolovaných plic potencovala vasokonstriční odpověď vyvolanou akutní hypoxií (Archer, Tolins et al. 1989; Persson, Gustafsson et al. 1990; Robertson, Warren et al. 1990; Ogata, Ohe et al. 1992; Sprague, Thiemermann et al. 1992; Barer, Emery et al. 1993; McCormack and Paterson 1993; Oka, Hasunuma et al. 1993; Zhao, Crawley et al. 1993; Dumas, Dumas et al. 1994; Leeman, De Beryl et al. 1994; Persson, Kalzén et al. 1994). Protože inhibice NO za normoxických podmínek neměnila bazální tonus, je zesílení hypoxické presorické odpovědi při inhibici NO vysvětleno tím, že se NO při akutní hypoxii uvolňuje ve větší míře. Potenciace hypoxické plicní vasokonstrikce použitím inhibitorů NOS byla popsána též u lidí - pro přehled viz (Hampfl and Herget 2000). Syntéza NO je v plicních cévách při akutní hypoxii zvýšená a NO zřejmě svým protektivním vazodilatačním účinkem brání nadměrnému vzestupu tlaku krve a tím i mechanickému poškození cévní stěny.

1.3.4. Úloha NO při vzniku HPH

Role NO při vzniku plicních vaskulárních změn spojených s plicní hypertenzí byla intenzivně studována v experimentech na zvířatech vystavených chronické hypoxii. Stále však existují rozdílné názory na to, zda

produkce NO v průběhu chronické hypoxie narůstá nebo klesá a do jaké míry změna produkce NO ovlivní cévní remodelaci a vazokonstrikci při rozvoji hypoxické plicní hypertenze.

Starší studie naznačovaly, že pokles endoteliální syntézy vazodilatačně a antiproliferačně působícího NO by mohl být jedním z mechanismů, který vyvolává zvýšení plicního cévního odporu v průběhu rozvoje HPH (Rodman, Yamaguchi et al. 1990; Adnot, Raffestin et al. 1991; Dinh-Xuan, Higenbottam et al. 1991; Carville, Raffestin et al. 1993; Maruyama and Maruyama 1994). Snížená dostupnost NO při chronické hypoxii by mohla působit zvýšení plicního cévního tonu a k facilitaci remodelace cévní stěny a tím k rozvoji HPH. Redukce endoteliální produkce NO byla pozorována u dětí s vrozenými srdečními vadami (Celermajer, Sorensen et al. 1993) a u dospělých s primární PH (Riley, Porszasz et al. 1997). Na druhé straně Xue a kol. a další prokázali, že chronická hypoxie indukuje expresi NOS v hladkých svalových buňkách plicních artérií potkanů de novo a zároveň zde také zvyšuje aktivitu NOS (Xue, Rengasamy et al. 1994; Shaul, North et al. 1995; Le Cras, Xue et al. 1996; Xue and Johns 1996; Carville, Adnot et al. 1997; Frank, Horstman et al. 1998; Resta, Chicoine et al. 1999; Tyler, Muramatsu et al. 1999). NO produkovaný při chronické hypoxii ve vyšší míře tak může působit proti nadměrnému zvýšení odporu v plicních cévách. Tuto možnost podpořily i další studie, které prokázaly, že blokáda NO syntézy pomocí NOS inhibitorů zvyšuje perfúzní tlak v plicích izolovaných z chronicky hypoxických zvířat mnohem více než v plicích normoxických kontrol (Barer, Emery et al. 1993; Isaacson, Hampl et al. 1994). NO též může částečně tlumit rozvoj plicní hypertenze díky své antiproliferační aktivitě. Inhibicí proliferace hladkých svalových buněk a fibroblastů může NO

příznivě ovlivnit přestavbu cévní stěny. Avšak neméně důležitý je fakt, že NO je také velmi aktivní radikál (Freeman 1994). Expozice účinkům NO po delší dobu vyvolá poškození plicní tkáně, které má všechny rysy oxidačního poškození (Clutton-Brock 1967; Quinn and Vallance 1993; Anggard 1994). Mimoto nestabilní molekula NO rychle reaguje s ROS- zejména se superoxidem (viz výše) za vzniku reaktivního peroxynitritu (Rubbo, Radi et al. 1994). Peroxynitrit je velmi silný oxidant s krátkým poločasem (Beckman, Beckman et al. 1990). Obvykle používaným indikátorem peroxynitritového poškození tkání je 3-nitrotyrosin. V séru hypoxických zvířat je koncentrace 3-nitrotyrosinu v porovnání se zvířaty normoxickými signifikantně vyšší (Herget, Wilhelm et al. 2000). Zvýšená koncentrace NO a zároveň ROS v průběhu HPH může podmínit tvorbu většího množství peroxynitritu a jeho metabolitů a tím indukovat poškození stěny plicních cév (Haddad, Pataki et al. 1994; Beckman and Koppenol 1996). Z toho vyplývá, že zvýšení syntézy NO při chronické hypoxii může mít dva protikladné účinky. Na jedné straně působí NO vazodilataci a brání poškození tenkého alveolokapilárního rozhraní. Zároveň snižuje proliferaci mesenchymových buněk v cévní stěně a tím zřejmě omezuje cévní remodelaci, čímž brzdí rozvoj plicní hypertenze. Na druhé straně může NO v počáteční fázi vystavení hypoxii naopak sám přispívat k radikálovému poškození plicní tkáně a tím ke vzniku plicní hypertenze (Hampl and Herget 2000).

V naší studii jsme proto vycházeli z předpokladu, že pokud NO díky své radikálové povaze přispívá k poškození stěny periferních plicních cév a podílí se tím na rozvoji HPH, děje se tak především na začátku expozice hypoxii. Očekávali jsme tedy nárůst syntézy NO v plicích v průběhu prvních dní

expozice hypoxii a tudíž nárůst koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu. Zároveň jsme předpokládali, že inhibicí syntézy NO v tomto období (1. týden chronické hypoxie) můžeme zredukovat PH, zatímco inhibicí NO syntézy v pozdějším období expozice chronické hypoxii (3. týden chronické hypoxie) bychom již PH neměli ovlivnit.

1.3.5. Úloha iNOS v patogenezi HPH

Původně se změny produkce NO v plicních cévách přisuzovaly změně exprese či aktivity eNOS. Carville a kol. však poskytli důkazy o tom, že ve zvýšené míře produkovaný NO v izolovaných plicních artériích potkanů vystavených dlouhodobé hypoxii nepochází z endotelu (Carville, Adnot et al. 1997). To naznačuje, že při chronické hypoxii by mohl být NO v plicních tvořen jiným subtypem NOS. Ačkoliv se za fyziologických podmínek iNOS v plicních cévách nenachází, při chronické hypoxii zde byla její přítomnost opakovaně prokázána (Xue and Johns 1996; Resta, O'Donoghuy et al. 1999). Předpokládali jsme proto, že při chronické hypoxické plicní hypertenzi může být dalším významným zdrojem NO právě iNOS.

Jelikož je iNOS zvýšeně exprimována při tkáňovém poškození (Darley-Usmar, Wiseman et al. 1995), předpokládali jsme, že NO je na začátku expozice chronické hypoxii zvýšeně produkovaný právě díky zvýšené aktivitě iNOS. Očekávali jsme proto, že imunohistochemické vyšetření prokáže expresi iNOS v plicních cévách potkanů vystavených chronické hypoxii na začátku této expozice. Jestliže je NO podílející se na rozvoji HPH generovaný v časných

fázích CH převážně iNOS izoformou, potom inhibicí syntézy NO pomocí selektivního inhibitoru iNOS izoformy - L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine (L-NIL) podávaného v tomto období zredukujeme PAP chronicky hypoxických zvířat stejně účinně jako pomocí neselektivního inhibitoru všech izoform NOS - N^G-nitro - L - arginine methyl ester (L-NAME) podávaného rovněž v té době. Testování této hypotézy bylo dalším z cílů této práce.

1.4. Žírné buňky a jejich úloha při rozvoji HPH

Žírné buňky (heparinocyty, mastocyty) jsou distribuované téměř ve všech tkáních a orgánech. Soustřeďují se převážně v místech, která jsou v kontaktu se zevním prostředím tj. v podkožních a podslizničních oblastech. Sem přicházejí jako nediferencované progenitorové buňky, které zde prolifерují a vlivem mikroprostředí se diferencují v jednotlivé subtypy. Jejich cytoplazmatická (sekreční) granula obsahují mediátory s různými účinky: biogenní aminy, proteoglykany, proangiogenní faktory, proteolytické enzymy a další. Žírné buňky se tak podílejí na řadě fyziologických a patofyziologických procesů. Jsou též buňkami, které perivaskulárně spouštějí zánětovou odpověď. Poznatky posledních let ukazují, že žírné buňky zasahují do dějů, jejichž společným rysem jsou změny pojivové tkáně: remodelace cévní stěny provázející vznik aterosklerózy (Kelley, Chi et al. 2000) a angiogeneze.

Akumulace žírných buněk ve stěně plicních cév a v jejich okolí při chronické hypoxii byla popsána již před čtyřiceti lety (Kay, Waymire et al. 1974; Tucker, McMurtry et al. 1977). O něco později vznikly i studie, které ukázali, že u chronicky hypoxických zvířat inhibice degranulace žírných buněk do jisté míry redukuje rozvoj HPH (Kay, Suyama et al. 1981). V této době byly žírné buňky dávány do souvislosti s rozvojem HPH především kvůli jejich schopnosti uvolňovat serotonin. Předpokládalo se totiž, že jednou z možných příčin vzniku plicní hypertenze je vazokonstrikce plicních cév vyvolaná serotoninem uvolněným z žírných buněk.

Třebaže serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT) obvykle působí u řady živočišných druhů plicní vazokonstrikci (Voelkel 1997), u lidí je jeho vazokonstrikční vliv na plicní cévy podstatně slabší (Widimsky 1975). Je tedy zřejmé, že i pokud se tento mechanismus u lidí uplatní, není úplným vysvětlením vlivu serotoninu na změny vzniklé v plicní cirkulaci při rozvoji HPH. Charakteristickou známkou PH je proliferace buněk hladkého svalu ve stěně plicních cév. Jak je dnes známo, serotonin a jeho transportní molekula (5-HTT), hrají důležitou roli ve stimulaci proliferace hladkých svalových buněk plicních cév a to nejenom u experimentálního modelu PH, ale též u lidí s primární i sekundární PH (Eddahibi, Fabre et al. 1999; Marcos, Fadel et al. 2004). Tento mechanismus by se mohl uplatnit v patogenezi HPH avšak není ještě zcela přesně objasněn.

Dnes se o účasti žírných buněk v mechanismu rozvoje HPH uvažuje především díky jejich kolagenolytickému potenciálu. V hypoxické tkáni, jak již

bylo zmíněno výše (*kap. 1.2.1.2.A*), jsou žírné buňky důležitým zdrojem kolagenolytických metaloproteináz (Tozzi, Thakker-Varia et al. 1998).

Vzestup kolagenolytické aktivity na začátku chronické hypoxie má kauzální roli v rozvoji HPH (Bacakova, Wilhelm et al. 1997; Novotná and Herget 1998). Podávání specifického inhibitoru kolagenolytických metaloproteináz (MMP) současně s vystavením chronické hypoxii totiž značně omezuje rozvoj plicní hypertenze (Herget, Novotna et al. 2003).

Maxová a kol. prokázali, že v žírných buňkách, izolovaných z plic laboratorního potkana a následně vystavených hypoxii, je celková aktivita kolagenolytických enzymů zvýšená a jejich sekreční granula jsou naplněna intersticiální kolagenázou MMP-13 (Maxova, Novotná et al. 2002). Intersticiální kolagenáza MMP-13, která zahajuje degradaci kolagenu, podmiňuje vznik typických nízkomolekulárních štěpů kolagenů (1/4 a 3/4 fragment) (*viz kap. 1.2.1.2 A*). Množství kolagenních štěpů této velikosti je v extraktu periferních plicních artérií větší na počátku hypoxické expozice (Novotna, Bibova et al. 2001). Toto zjištění svědčí pro působení intersticiální kolagenázy MMP-13 (Novotna and Herget 1998; Novotna and Herget 1998) specificky právě na začátku rozvoje HPH a tudíž i pro roli jejího zdroje – žírných buněk v tomto procesu.

Vajner a kol. navíc ještě přímo prokázali, že žírné buňky se zvýšenou expresí MMP-13 se koncentrují na začátku expozice chronické hypoxii v těsné blízkosti periferních plicních cév (Vajner, Vytasek et al. 2006).

Tato skutečnost podporuje naši hypotézu, podle které plicní perivaskulární žírné buňky přispívají k vaskulární remodelaci při rozvoji HPH tím, že v prvních dnech chronické hypoxie uvolňují kolagenolytické enzymy.

Předpokládali jsme proto, že pokud zabráníme degranulaci žírných buněk na začátku expozice chronické hypoxii, zamezíme tím uvolnění jejich proteolytických enzymů včetně MMP - 13. Tímto mechanismem by mělo být zabráněno štěpení kolagenu v periferních plicních cévách. Nízkomolekulární štěpy kolagenu jsou, jak bylo zmíněno výše, jedním z možných stimulů remodelace cévní stěny.

2. CÍLE POKUSŮ

V první části naší práce jsme se zabývali roli NO v mechanismu rozvoje HPH. Zároveň bylo naším cílem najít zdroj NO syntézy v plicích při chronické hypoxii.

Na začátku rozvoje HPH je klíčovým momentem poškození stěny plicních cév následkem zvýšené tvorby ROS (Kinnula, Crapo et al. 1995).

NO, jehož tvorba je během hypoxie rovněž zvýšená, velmi snadno reaguje s ROS za vzniku dalších cytotoxických derivátů (např. peroxyinitrit) (Rubbo, Radi et al. 1994). Je proto možné, že NO zvýšeně produkováný v prvních dnech hypoxické expozice, přispívá k oxidačnímu stresu plicní tkáně a podílí se tak na radikálovém poškození stěny plicních cév.

Při tkáňovém poškození je zvýšeně exprimována iNOS izoforma NO - syntázy (Darley-USmar, Wiseman et al. 1995). Předpokládáme proto, že NO je při chronické hypoxii zvýšeně generováný právě tímto subtypem NOS. Dosavadní výsledky experimentů naší skupiny naznačily, že kritickým obdobím pro rozvoj plicní hypertenze jsou první dny hypoxické expozice. Důležité je proto, zda syntéza NO narůstá právě v této fázi hypoxické expozice.

Dlouhou dobu byly pro chronickou inhibici NO syntézy používány neselektivní inhibitory NOS : N^{omega}-nitro-L-arginin metylester (L-NAME) nebo N^G-monometyl-L-arginin (L-NMMA) (Rees, Palmer et al. 1990; Hampl, Archer et al. 1993; Moncada 1994). Metodologicky to bylo velmi výhodné, protože tyto inhibitory mohli být zvířatům dlouhodobě podávány ve vodě k napájení. Na začátku devadesátých let byl objeven selektivní inhibitor iNOS

izoformy- L-N6-(1-iminoethyl) lysin (L-NIL) (Moore, Webber et al. 1994). L-NIL byl použit v experimentech in vitro a u anestetizovaných zvířat. Nebyla však k dispozici data týkající se selektivní a účinné dávky L-NIL pro dlouhodobé perorální podávání. Jedním z cílů naší studie bylo zjistit zda se iNOS podílí na rozvoji HPH. To znamenalo zkoumat následky dlouhodobé inhibice iNOS pomocí jejího selektivního inhibitoru. Protože, jak jsme již uvedli, nebyla dosud stanovená selektivní a efektivní dávka tohoto inhibitoru pro jeho dlouhodobé perorální používání, bylo naší snahou v první řadě stanovit tuto dávku.

CÍLE PRVNÍ ČÁSTI PRÁCE:

1. stanovit efektivní a selektivní dávku L- NIL pro jeho dlouhodobé podávání
2. zjistit zda se NO zvýšeně produkováný při hypoxii podílí na rozvoji HPH
3. zjistit zda zdrojem NO při rozvoji HPH je iNOS
4. monitorovat změny tvorby NO v průběhu expozice chronické hypoxii
5. monitorovat změny tvorby metabolitů ROS a NO tj. nitrotirosinu (derivátu peroxyinitritu) v průběhu expozice chronické hypoxii

V druhé části naší práce jsme se zaměřili na roli žírných buněk v mechanismu HPH.

Účast žírných buněk na remodelaci periferních plicních cév (Riley, Thakker-Varia et al. 2000; Novotna and Herget 2002) při vzniku HPH byla zvažována na základě údajů, které prokázali jejich podíl na vzniku vaskulárních změn při rozvoji aterosklerózy. Dalším faktem, který podpořil tuto hypotézu bylo

zjištění, že v prvních dnech expozice chronické hypoxii je zvýšená kolagenolytická aktivita (Novotná, Herget et al. 1999). Je známo, že důležitým zdrojem kolagenolytických enzymů jsou žírné buňky (Tozzi, Thakker-Varia et al. 1998).

CÍLE DRUHÉ ČÁSTI PRÁCE:

1. zjistit zda se žírné buňky podílejí na remodelaci periferních plicních cév při rozvoji HPH
2. zjistit zda zablokování degranulace žírných buněk v časně fázi hypoxické expozice ovlivní velikost PH více než na konci hypoxické expozice, kdy je PH již rozvinutá

3. METODIKY

V této kapitole jsou nejprve obecně popsány použité experimentální techniky, anestézie a pod. Poté následuje kapitola, která se zabývá detailním uspořádáním jednotlivých pokusů.

3.1. Laboratorní zvířata

Pokusy byly prováděny na dospělých samcích potkana (*Ratus norvegicus*) laboratorního kmene Wistar z konvenčního chovu (Anlab). Hmotnost zvířat se pohybovala v rozmezí od 250 g do 450 g. Během pokusů byla zvířata ošetřována běžným způsobem v místním zvěřinci. Počty zvířat v nádrži se řídily vyhláškou č. 207/200 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Ke krmení zvířat byly použity standartní peletové diety (Dieta pro myši a potkany v SPF chovech, Mlýn Kocanda- výroba krmných směsí, Jesenice u Prahy) a pitná voda ad libitum.

3.2. Anestézie

V pokusech byly operace a měření prováděny v celkové anestézii s použitím Thiopentalu 1% (Thiopentalum natricum) aplikovaného intraperitoneálně v dávce 40mg/kg tělesné hmotnosti, Rometaru 2% (Xylazinum hydrochloridum) aplikovaného intramuskulárně v dávce 16mg/kg a Narkamonu (Ketamini hydrochloridum) intraperitoneálně v dávce 100mg/kg. Úroveň anestézie byla kontrolována reakcí na bolestivý podnět a sledováním pravidelnosti dýchání.

3.3. Indukce a hodnocení vzniku hypoxické plicní hypertenze

Pro vyvolání hypoxické plicní hypertenze byla zvířata vystavená chronické hypoxií v izobarické hypoxické komoře $FiO_2 = 0,1$ (kap. 3.4.1). Přítomnost HPH byla hodnocená katetrizačním vyšetřením krevního tlaku v plicnici (PAP) (kap. 3.4.3.1) bez otevření hrudní dutiny, váhou srdečních oddílů a kvantitativním morfologickým vyšetřením plicních cév (kap. 3.5.2).

3.4. Použité techniky

3.4.1. Izobarická hypoxická komora

V experimentech uvedených v této práci byla k vytvoření modelu plicní hypertenze použita izobarická hypoxická komora (Herget and Palecek 1985). Jedná se o uzavřený systém, ve kterém vzduch cirkuluje průtokem 6-8 L/min okruhem, který slouží k odstraňování vlhkosti, CO_2 a tepla vytvořených metabolickou činností zvířat. CO_2 je absorbován v nasyceném roztoku hydroxidu draselného (KOH) a pevným CO_2 absorbentem tzv. „nátronovým vápnem,“ (pevná směs NaOH a Ca_2OH). Tento absorbent navíc změnou barvy granulí signalizuje převýšení kapacity obou absorbérů. Součástí okruhu je také chladicí jednotka, která slouží ke kondenzaci vodních par a k odvádění přebytečného tepla. Obsah kyslíku v hypoxické komoře průběžně snímá Clarkovo elektroda, jež při poklesu koncentrace kyslíku pod libovolně nastavitelnou mez samočinně zapne čerpadla, která dočerpávají do komory vzduch. Tím je obsah kyslíku v hypoxické komoře udržován na požadované úrovni. Pojistným prvkem bránícím vzniku přetlaku je přetlakový vodní ventil. Ventil tvoří trubice, která je vyvedená z komory do nádoby naplněné vodou cca

1 cm pod vodní hladinu. Koncentrace CO_2 v komoře je pravidelně (á 10 min.) měřena a registrována. Navíc je zde již zmíněný barevný indikátor („nátronové vápno“). Zařízení nevyžaduje trvalý dohled ani mimořádná bezpečnostní opatření.

S minimálními nároky na údržbu (výměna KOH, nátronového vápna, péče o zvířata) může být v provozu po dobu několika týdnů. Izobarická hypoxická komora umožňuje vystavit libovolnému stupni hypoxie na jakoukoliv dobu současně až 30 potkanů. Ve všech experimentech byla expozice hypoxií přerušovaná na dobu 30 min., a to každý 2.-3. den expozice, pro nutný úklid akvárií a krmení zvířat.

3.4.2 Měření NO ve vydechovaném vzduchu

Koncentraci NO ve vydechovaném vzduchu jsme měřili pomocí chemoluminiscenčního analyzátoru (CLD 77 AM chemiluminescence analyzer, EcoPhysis, Duernten, Switzerland).

Na základě měření koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu jsme stanovili :

- a) efektivní dávku selektivního inhibitoru iNOS - L-NIL pro jeho chronické perorální podávání
- b) produkci NO v průběhu expozice chronické hypoxií a zároveň účinnost inhibice NO syntézy při této expozici

*a) stanovení efektivní dávky L-NIL pro dlouhodobé perorální podávání
(kap. 4.1.1)*

Při tomto měření byla zvířata uvedená do celkové anestezie (ketamin + xylazin), poté jim byla provedena tracheotomie a zavedená tracheostomická kanyla. K tracheostomické kanyle byl připojený rezervoár vyrobený z kondomu, do kterého byl zachycován vydechovaný vzduch. Rezervoár byl připojený k tracheostomické kanyle pomocí třicestného ventilu, který umožňoval akumulaci vydechovaného vzduchu v rezervoáru a zároveň bránil míchání vdechovaného a vydechovaného vzduchu. Zvířata vydechovala vzduch do rezervoáru po dobu 2 minut.

*b) stanovení produkce NO při chronické hypoxii a inhibice syntézy NO
při chronické hypoxii (kap.4.1.2, kap.4.1.3, kap. 4.1.4)*

Toto měření se provádělo opakovaně v průběhu hypoxické expozice a bylo prováděno u bdělých zvířat. Každé zvíře bylo pro tento účel umístěné do vzduchotěsné nádoby (2,1 L). Nádoby byly před umístěním zvířat propláchnuty a naplněny vzduchem z tlakové nádoby s jasně definovanou směsí plynů, bez obsahu NO. Proto vzduch v nádobě před umístěním zvířat NO bezpečně neobsahoval. Koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu byla měřena po 15-ti minutové akumulaci vydechovaného vzduchu v nádobě.

3.4.3. Hemodynamická měření

Při měření hemodynamických parametrů byla zvířata uvedena do celkové anestezie (thiopental). Měřili jsme tlak v a. pulmonalis (PAP), srdeční výdej (CO) a systémový střední arteriální tlak (SAP).

3.4.3.1. Katetrizace plicnice

Tlak v a. pulmonalis byl měřen pomocí tvarovaného termoplastického polyethylenového katétru (vnější průměr 1.1 mm, vnitřní průměr 0,75 mm). Katétr byl do plicní artérie zaváděn cestou vypreparované v. jugularis interna při zavřeném hrudníku u spontánně ventilujících zvířat (Herget and Palecek 1972; Hampl and Herget 1990). Nejprve byla cestou vena jugularis interna a vena cava superior do pravé srdeční komory zavedena vodící kanyla (vnitřní průměr vodící kanyly je 1.2 mm). Když byla špička vodící kanyly v pravé srdeční komoře, byl z ní vysunut polyethylenový katétr. Jeho konec byl předem teplem tvarován tak, aby se ihned po vysunutí z kanyly začal otáčet nazpět do výtokové části komory. Jemnou manipulací byl pak katétr zaveden do plicnice. Když byl katétr bezpečně umístěn v hluboko v plicnici, vodící kanyla byla odstraněná. Katétr naplněný roztokem heparinu byl připojen k tlakovému snímači. Jeho výstup jsme sledovali na monitoru. Informaci o lokalizaci katétru poskytuje tvar křivky na monitoru obdobně jako při zavádění Swan-Ganzova katétru, užívaného k monitoraci hemodynamických parametrů v humánní medicíně.

3.4.3.2. Měření minutového srdečního výdeje

Měření srdečního minutového výdeje jsme prováděli při otevření hrudníku a umělé plicní ventilaci. Poté, co jsme získali validní hodnoty PAP, byla zvířatům provedena tracheotomie, již byla zavedená tracheostomická kanyla. Cestou tracheostomické kanyly byla zvířata ventilována pomocí ventilátoru normoxickou směsí plynů, frekvencí 60 dechů/ min., (pozitivní tlak na začátku vdechu 10 cm H₂O, tlak na konci výdechu 0 cm H₂O).

Srdeční výdej byl stanoven na základě měření průtoku krve ascendentní aortou pomocí ultrazvukového průtokoměru (2,5mm SS-series s J reflektorem + T 106 flowmetr, Transonic System, Ithaca, NY, USA). Z tohoto důvodu jsme provedli sternotomii. Krevní ztráta při tomto výkonu byla minimální. Hodnota CO vztážená k tělesné hmotnosti je srdeční index (CI).

Hodnoty získané touto metodou jsou nižší (díky anestézii a thorakomii) než skutečné hodnoty měřené in vivo při intaktním hrudníku. Srovnání mezi jednotlivými skupinami bylo možné díky tomu, že touto chybou byly systematicky ovlivněné všechny skupiny.

3.4.3.3. Měření systémového středního arteriálního tlaku

Systémový střední arteriální tlak byl měřen přímou metodou pomocí polyethylenové kanyly zavedené do a. carotis interna. Katétr byl připojen k tlakovému snímači a monitoru. Toto měření bylo provedeno u zvířat v celkové anestezii. Pouze v experimentu, kdy jsme stanovovali selektivní dávku L-NIL (kapitola 4.1.1), byl SAP měřen neinvazivní metodou na ocasní tepně potkanů (Heller and Hellerova 1998) u bdělých zvířat.

3.5. Kvantitativní morfologická vyšetření

3.5.1. Analýza váhy jednotlivých srdečních oddílů

Jedním z parametrů reflektujících chronickou hypoxii indukovanou plicní hypertenzi je hypertrofie pravé srdeční komory. Po provedení všech plánovaných měření, byla srdce vyjmutá z hrudníku. Levé srdeční komory se septem (LV+S) byly odděleny od pravých komor (RV) a tyto oddíly byly zváženy. Poměrem váhy (RV/LV+S) lze vyjádřit míru hypertrofie pravé komory při plicní hypertenzi (Fulton 1952).

3.5.2. Histologické vyšetření

Muskularizaci plicních arteriál během chronické hypoxie lze hodnotit počítáním podílů muskularizovaných periferních arteriál k celkovému počtu tenkých cév (Herget and Paleček 1978). K histologickému vyšetření jsme plíce připravovali fixací v 10% roztoku neutrálního formolu. Plíce jsme tímto roztokem plnili tracheou pod hydrostatickým tlakem 12 cm vodního sloupce. Ve stejném roztoku pak zůstali uloženy na několik dní k další fixaci. Po zalutí do parafínu byly připraveny frontální řezy v úrovni hilu. Ty byly barveny hematoxylinem-eozinem. Na barvení elastických vláken byl použit modrý trichróm. Z každého zvířete byl vyšetřen vždy celý řez plicí při zvětšení 25 x 16 (přibližně 160 polí). V připravených řezech jsme hodnotili všechny cévy, které měly průměr menší než 50 μm . Jako muskularizované jsme označili ty cévy, které měly dvojitou elastickou vrstvu na více než polovinu svého obvodu. Poměr jejich počtu k celkovému počtu distenzních plicních cév vyjadřuje míru muskularizace periferního plicního řečiště (Herget, Suggett et al. 1978).

3.6. Statistické zpracování výsledků

Pro statistické zpracování výsledků byly podle počtu srovnávaných skupin použity testy : nepárový t-test nebo ANOVA následovaná Fischerovým post hoc testem. Pracovali jsme s programem Stat View, verze 5.0.1 (SAS Institute, Cary , NC). Hladina významnosti $p < 0.05$ byla považována za signifikantní. Výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty \pm SEM. Počty měření pro danou veličinu jsou uvedeny v tabulkách a na obrázcích.

4. PROTOKOLY JEDNOTLIVÝCH POKUSŮ A VÝSLEDKY

4.1. **INDUKCE iNOS INICIUJE ROZVOJ HPH** (PŘÍLOHA A)

4.1.1. **Stanovení dávky L-NIL pro dlouhodobé perorální podávání**

PROTOKOL POKUSU:

Pro určení role iNOS při tkáňovém poškození bylo nutno stanovit efektivní a selektivní dávku iNOS inhibitoru - L-NIL pro chronické perorální podávání.

POROVNÁVALI JSME 4 SKUPINY ZVÍŘAT :

Skupina L-NIL 3 mg/l dostávala L-NIL v dávce 3 mg/l, (n= 7).

Skupina L-NIL 8mg/l dostávala L-NIL v dávce 8 mg/l, (n=7).

Skupina kontrolní dostávala čistou vodu, (n=8).

Pro porovnání jsme použili dobře popsany a dlouhodobě používaný neselektivní inhibitor NOS – L-NAME ve standartně používané dávce, proto

Skupina L-NAME dostávala L-NAME v dávce 500 mg/l, (n=7).

L-NIL a L-NAME jsme potkanům podávali rozpuštěný ve vodě k napájení. Selektivita L-NIL byla nepřímo prokázána měřením SAP.

Inhibice eNOS působí nárůst systémového arteriálního tlaku (Rees, Palmer et al. 1989). Abychom se ujistili, že L-NIL v námi stanovených dávkách neinhibuje eNOS, měřili jsme SAP neinvazivní metodou na ocasní tepně potkanů po třech dnech podávání L-NIL (kap. 3.4.3.3).

Poté byla zvířata uvedena do celkové anestezie (ketamin+ xylazin) a byla jim provedena tracheostomie a zavedena tracheostomická kanyla. Vydechovaný

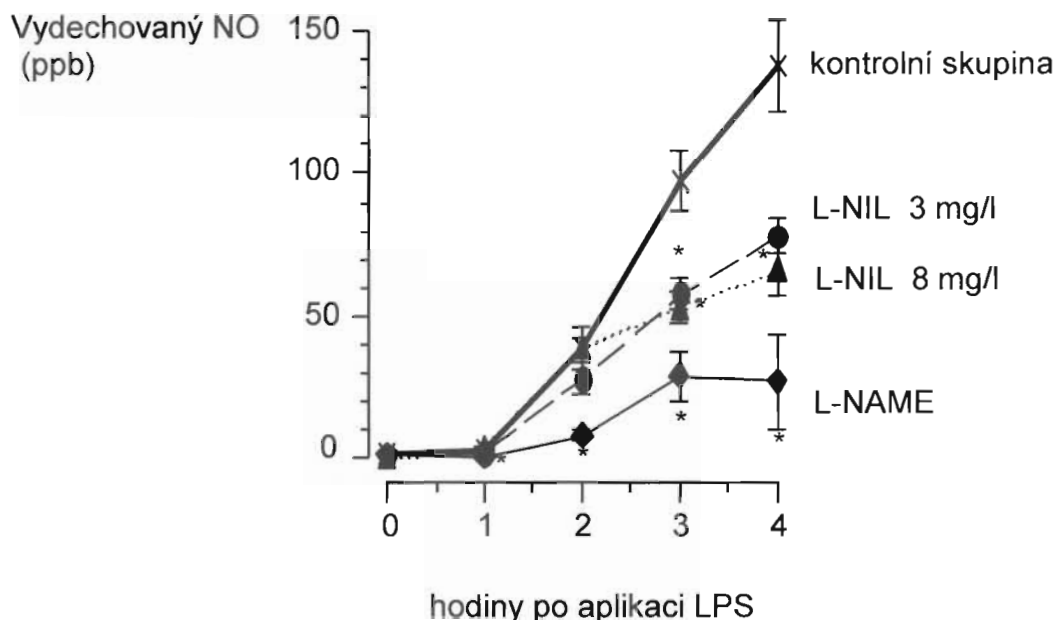
vzduch byl zhromažďovaný po dobu 2 min. do upraveného kondomu připojeného k tracheostomické kanyle. Koncentraci NO ve vydechovaném vzduchu jsme měřili chemoluminiscenčním NO analyzátozem (kap. 3.4.2 a).

Bezprostředně po prvním měření koncentrace NO jsme potkanům k indukci exprese iNOS aplikovali LPS (5 mg/kg tělesné hmotnosti) do v. jugularis interna. Poté jsme koncentraci NO analyzovali po 60, 120, 180 a 240 min.

VÝSLEDKY:

Před aplikací LPS byla koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu na hranici detekčního limitu NO analyzátoru (1ppb) a nebyly výrazné rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Hodinu po aplikaci LPS se hladina NO ve vydechovaném vzduchu nezměnila, ale po 2 hod. jsme již zaznamenali nárůst koncentrace NO. U zvířat, kde syntéza NO nebyla blokována žádným z inhibitorů, koncentrace NO dále narůstala až do 4. hodiny po aplikaci LPS, kdy jsme pokus ukončili. U skupiny s dávkou L-NIL 3 mg/l byl nárůst koncentrace NO v dalším průběhu ztlumen o 50%. Vyšší dávka L-NIL již neměla další inhibiční účinek na tvorbu NO, proto skupina L-NIL 8mg/l měla v porovnání se skupinou L-NIL 3mg/l podobný časový průběh nárůstu koncentrace NO (obr. 2). Tím byla stanovená maximální efektivní dávka.

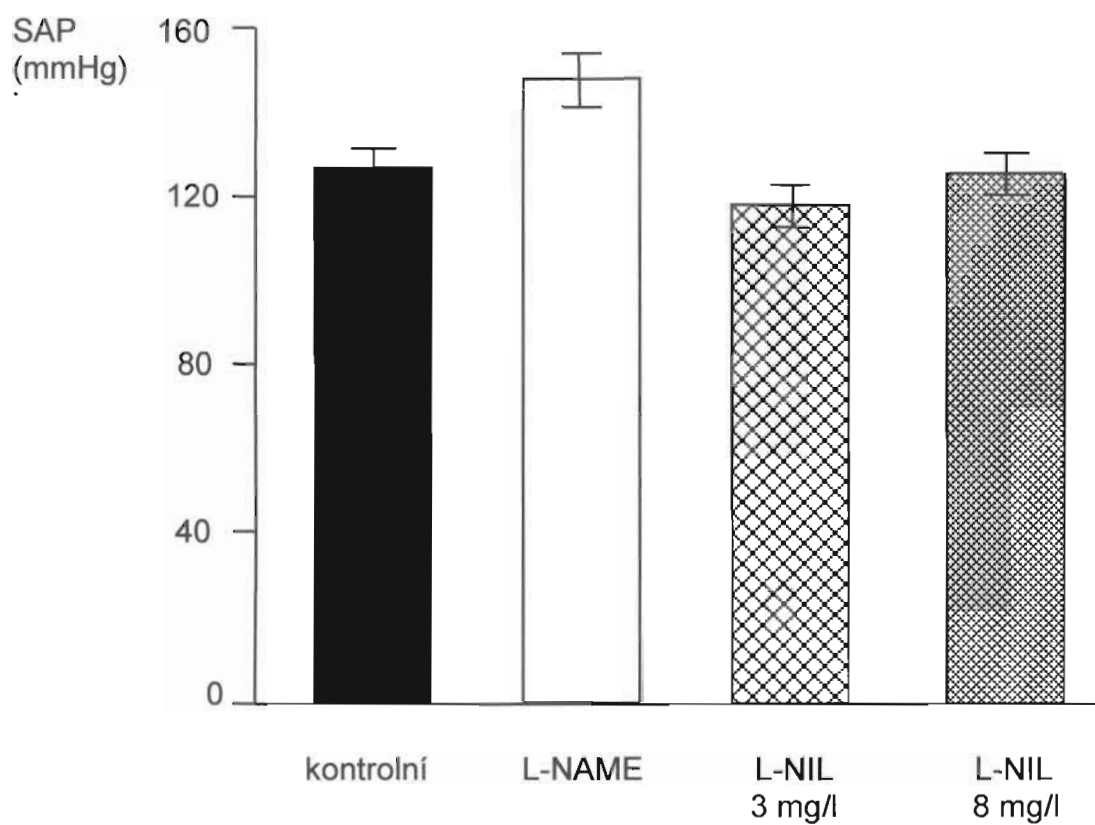
L-NAME (v podané dávce) zredukoval koncentraci vydechovaného NO více než L-NIL.



Obr. 2. Selektivní inhibice iNOS při perorálním podávání L-NIL

L-NIL 3 mg/l = skupina, která dostávala L-NIL (3 mg/l), **L-NIL 8mg/l** = skupina, která dostávala L-NIL (8 mg/l), **kontrolní** = skupina, která dostávala čistou vodu, **L-NAME**= skupina, která dostávala L-NAME (500 mg/l). Data jsou uváděna jako průměrné hodnoty \pm SEM.

Signifikantní nárůst SAP vyvolala aplikace L-NAME, nikoliv L-NIL byť ve vyšší dávce (*obr. 3*). To dokazuje, že maximální efektivní dávka L-NIL (8mg/l) inhibuje aktivitu iNOS, ale nepůsobí neselektivně na eNOS. Protože IC 50 L-NIL pro nNOS izoformu je podle literatury 30x větší než pro iNOS (Moore, Webber et al. 1994), lze předpokládat, že L-NIL v dávce použité v tomto experimentu nebude mít vliv ani nNOS.



Obr. 3. Inhibice iNOS nepůsobí vzestup SAP

L-NIL 3 mg/l = skupina, která dostávala L-NIL (3 mg/l), **L-NIL 8mg/l** = skupina, která dostávala L-NIL (8 mg/l), **kontrolní** = skupina, která dostávala čistou vodu, **L-NAME** = skupina, která dostávala L-NAME (500 mg/l). Data jsou uváděná jako průměrné hodnoty \pm SEM.

1-TÝDENNÍ HYPOXIE

4.1.2. Inhibice NOS v průběhu jednotýdenní hypoxické expozice

PROTOKOL POKUSU :

K testování hypotézy, podle které se NO podílí na rozvoji iniciální fáze hypoxické plicní hypertenze, jsme 24 potkanů po dobu 1 týdne vystavili hypoxii (10% O₂) v hypoxické normobarické komoře. V průběhu této expozice byl jedné skupině zvířat podáván ve vodě k napájení L-NAME-neselektivní inhibitor všech tří izoform NOS v dávce 500 mg/l. Další hypoxická skupina dostávala ve vodě k napájení selektivní inhibitor iNOS-L-NIL v námi stanovené dávce pro chronické perorální užití, a to 8mg/l. Zbylá zvířata, vystavená po dobu jednoho týdne hypoxii, dostávala pouze čistou vodu. Podávání NOS inhibitorů jsme zahájili již 3 dny před hypoxickou expozicí, aby v době zahájení hypoxické expozice byla v krvi a tkáních již účinná koncentrace inhibitorů.

Porovnávali jsme hypoxické skupiny, kterým jsme podávali inhibitory NOS, s hypoxickou skupinou, kde nebyl podáván ani jeden z inhibitorů, a se skupinou, která žila v normoxických podmínkách.

POROVNÁVALI JSME TYTO 4 SKUPINY :

Skupina H 1 týden - skupina vystavená hypoxii (10% O₂) po dobu 1 týdne bez podávání inhibitoru NOS, (n= 7).

Skupina H 1 týden + L-NIL - skupina vystavená hypoxii (10% O₂) po dobu 1 týdne. Zvířatům této skupiny byl v době hypoxické expozice podáván L-NIL v dávce 8mg/l, (n= 8).

Skupina H 1 týden + L- NAME - skupina vystavená hypoxii (10% O₂) po dobu 1 týdne. Této skupině byl v době hypoxické expozice podáván L-NAME v dávce 500mg/l, (n=9).

Skupina N - skupina, která žila po celou dobu experimentu v normoxii a nebyl jí podáván ani jeden z inhibitoru NOS, (n=8).

V tomto pokusu byla použita běžně užívaná efektivní dávka L-NAME pro dlouhodobé použití t.j. 500 mg/l g (Pechanova and Bernatova 1996; Tucker, Ledingham et al. 2000).

Selektivní a efektivní dávka L-NIL 8 mg/l pro dlouhodobé použití byla stanovena námi (kap. 4.1.1).

Koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu byla měřena bezprostředně po ukončení hypoxické expozice. Měření byla prováděná u bdělých zvířat. Zvířata byla umístěná ve vzduchotěsné nádobě. Koncentrace NO byla měřena po 15-ti minutové akumulaci vydechované vzduchu ve vzduchotěsné nádobě (kap. 3.4.2. b).

VÝSLEDKY :

Tělesná hmotnost

Všechna zvířata vystavená hypoxii měla nižší hmotnost než zvířata, která žila v normoxických podmínkách. Kromě toho zvířata, kterým byl v průběhu jednotýdenní hypoxické expozice zároveň podáván L-NIL, měla navíc signifikantně nižší hmotnost než zvířata zbylých dvou hypoxických skupin.

Systémový arteriální tlak, srdeční výdej

Týdenní aplikace L-NIL na rozdíl od L-NAME nevyvolala signifikantní nárůst SAP. Tím byla nepřímo potvrzena selektivita L-NIL. Aplikace L-NAME vedla k signifikantnímu poklesu CI (*tab.1*). Podávání L-NIL pokles CI nepůsobilo (ačkoliv počet naměřených hodnot byl v této skupině nižší).

Hypertrofie pravé komory

Expozice hypoxii po dobu jednoho týdne nevedla k signifikantní hypertrofii pravé komory (*tab.1*) a nebyly zaznamenány rozdíly v hmotnosti pravé komory mezi jednotlivými hypoxickými skupinami. Pravděpodobně proto, že podávání L-NAME v průběhu hypoxické expozice způsobilo vznik systémové hypertenze, byla hmotnost levé komory a septa (LV+S) vyšší u skupiny, které byl podáván L-NAME, než u skupiny, které byl podáván L-NIL (L-NIL nepůsobil vzestup SAP). Poměr hmotnosti pravé komory k hmotnosti levé komory a septa (RV/LV+S) byl naopak signifikantně vyšší u skupiny, která dostávala v průběhu hypoxie L- NIL (*tab. 1*).

Skupina	CI (ml/kg/min)	RV (mg)	LV+S (mg)	RV/LV+S
N	101 ± 7 (6)	182 ± 10	604 ± 19*	0.30 ± 0.02 (8)
H	107 ± 6 (5)	153 ± 7#	440 ± 8	0.35 ± 0.02 (7)
H+L-NAME	74 ± 3* (7)	149 ± 9#	460 ± 7 [¶]	0.32 ± 0.02 [¶] (8)
H + L-NIL	99 ± 15 (3)	160 ± 4	420 ± 14	0.38 ± 0.02# (9)

Tab. 1: CI, RV, LV+ S, RV/LV+S

N = kontrolní skupina žijící v normoxii, **H** = skupina vystavená 1 týden hypoxii (10% O₂), již nebyl v průběhu hypoxické podáván inhibitor NOS, **H + L-NAME** = skupina, které byl v průběhu hypoxické expozice podáván L-NAME (500mg/l), **H + L-NIL** = skupina, které byl v průběhu hypoxické expozice podáván L-NiL (8mg/l).

CI = srdeční index, **RV** = hmotnost pravé komory srdeční, **LV+S** = hmotnost levé komory srdeční se septem, **RV/LS + S** = poměr hmotností pravé srdeční komory a levé komory srdeční se septem.

* **p < 0.05** skupina lišící se od všech ostatních skupin

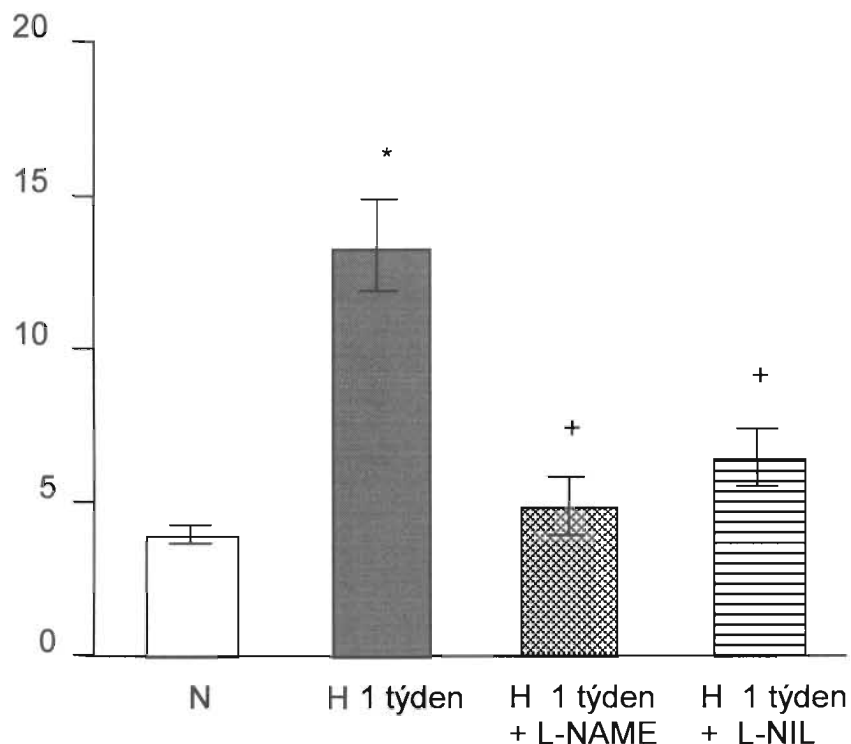
p < 0.05 skupina lišící se od normoxické skupiny

[¶] **p < 0.05** skupina lišící se od hypoxické skupiny, která dostávala L-NiL

Koncentrace NO ve vydechaném vzduchu

Po 15 minutové akumulaci vydechaného NO byla jeho koncentrace signifikantně vyšší u zvířat vystavených jednotýdenní hypoxii než u zvířat z normoxické skupiny. Koncentrace NO ve vydechaném vzduchu byla signifikantně snižena u zvířat, kterým byla v průběhu hypoxické expozice zároveň blokována syntéza NO pomocí selektivního i neselektivního NOS inhibitoru (obr. 4).

vydechovaný NO
(ppb)



Obr. 4. Nárůst koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu v průběhu jednoho týdne expozice hypoxií je inhibovaný podáváním L-NAME i L-NIL

N = kontrolní skupina žijící v normoxii, **H 1 týden** = skupina vystavená 1 týden hypoxií (10% O₂), již nebyl v průběhu hypoxické expozice podáván inhibitor NOS, **H 1 týden+L-NAME** = skupina, které byl v průběhu hypoxické expozice podáván L-NAME (500mg/l), **H 1 týden+L-NIL** = skupina, které byl v průběhu hypoxické expozice podáván L-NIL v (8mg/l).

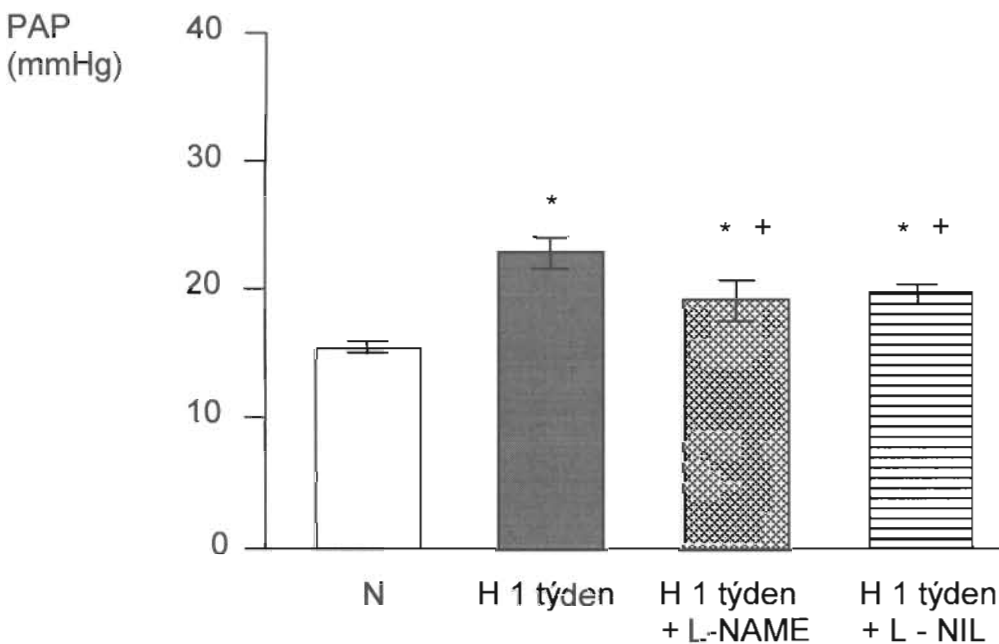
* **p < 0,05** hypoxická skupina H se statisticky významně liší od skupiny normoxické N.

+ **p < 0.05** hypoxické skupiny, kterým byl podáván L-NAME nebo L-NIL se signifikantně liší od hypoxické skupiny, které inhibitory podávány nebyly.

Data jsou uváděná jako průměrné hodnoty ± SEM.

PAP- inhibice NOS v průběhu jednotýdenní expozice hypoxii redukuje PH

Jeden týden hypoxické expozice vedl k signifikantnímu nárůstu PAP u všech hypoxických zvířat oproti zvířatům žijícím v normoxii (obr. 5). U potkanů, kterým byl v průběhu hypoxické expozice podáván selektivní nebo neselektivní inhibitor NOS, byl PAP signifikantně nižší než u potkanů, kterým ani jeden z inhibitoru podán nebyl. Mezi skupinami, kterým byl podáván L-NIL a L-NAME nebyly signifikantní rozdíly v PAP.



Obr. 5. Inhibice NOS v průběhu jednotýdenní hypoxické expozice redukuje PH

N = kontrolní skupina žijící v normoxických podmínkách, **H 1 týden** = skupina vystavená 1 týden hypoxii (10% O₂), již nebyl v průběhu hypoxické podáván inhibitor NOS, **H 1 týden + L-NAME** = skupina, které byl v průběhu hypoxické expozice podáván L-NAME (500mg/l), **H 1 týden + L-NIL** = skupina, které byl v průběhu hypoxické expozice podáván L-NIL (8mg/l).

* $p < 0,05$ všechny tři hypoxické skupiny (H, H 1 týden + L-NAME, H 1 týden+ L-NIL) se statisticky významně liší od skupiny normoxické N.

+ $p < 0,05$ hypoxické skupiny, kterým byl podáván L - NAME nebo L - NIL se statisticky významně liší od hypoxické skupiny, které inhibitory podávány nebyly. Data jsou uváděná jako průměrné hodnoty \pm SEM.

3–TÝDENNÍ HYPOXIE

4.1.3. Inhibice NOS v průběhu prvního týdne 3-týdenní hypoxie

PROTOKOL POKUSU :

V této fázi pokusu jsme zjišťovali, zda byl účinek inhibice NOS na začátku hypoxie překonán pokračující hypoxickou expozicí, přestože byla inhibice NOS v té době již přerušena. Pro tento účel jsme 3 skupiny laboratorních potkanů vystavili po dobu 3 týdnů hypoxii (10% O₂) opět v hypoxické normobarické komoře. Kontrolní skupina zvířat žila v normoxii.

Dvěma skupinám hypoxických zvířat byly ve vodě na pití podávány inhibitory NOS (L-NAME 500 mg/l nebo L-NIL 8mg/l). NOS inhibitory byly zvířatům podávány 3 dny před chronickou hypoxickou expozicí a v průběhu prvního týdne expozice. Třetí hypoxické skupině byla podávána čistá voda.

POROVNÁVALI JSME TYTO 4 SKUPINY:

Skupina N- kontrolní skupina žijící v normoxii, (n=6).

Skupina H - skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10% O₂), již nebyl v průběhu hypoxické podáván ani jeden z inhibitorů NOS, (n=8).

Skupina H 3 týdny + L-NAME 1. týden - skupina, které byl v průběhu 1. týdne třítydenní hypoxické expozice podáván ve vodě na pití neselektivní inhibitor L-NAME v dávce (500mg/l), (n=7).

Skupina H 3 týdny + L-NIL 1. týden - skupina, které byl v průběhu 1. týdne třítydenní hypoxické expozice podáván ve vodě na pití selektivní inhibitor L-NIL v dávce 8mg/l, (n=8).

V průběhu 3- týdenní hypoxie nebyly mezi jednotlivými skupinami pozorovány rozdíly v objemu vypité tekutiny. Po 3 týdnech hypoxické expozice byly měřeny SAP, PAP, CO, CI, (RV/LV+S) a vydechovaný NO.

VÝSLEDKY :

Tělesná hmotnost

Potkani vystavení chronické hypoxií po dobu 3 týdnů měli signifikantně nižší hmotnost než potkani, kteří žili v normoxických podmínkách (*tab. 2*).

Systémový arteriální tlak, srdeční výdej, hypertrofie pravé komory

V hodnotách SAP a CI nebyl mezi jednotlivými skupinami rozdíl (*tab. 2*).

U všech hypoxických skupin byl signifikantní nárůst RV/ LV+S (*tab. 2*).

Skupina	CI (ml/min/kg)	RV (mg)	LV+S (mg)	RV/LV+S
N	127 ± 15 (6)	183 ± 7*	703 ± 21*	0.26 ± 0.01* (6)
H	104 ± 5 (7)	285 ± 15	620 ± 23	0.46 ± 0.02 (8)
H+L-NAME 1. týden	127 ± 12 (4)	275 ± 12	627 ± 17	0.44 ± 0.03 (7)
H+L-NIL 1. týden	109 ± 13 (8)	238 ± 15 [†]	525 ± 23 [†] #	0.45 ± 0.03 (8)

Tab. 2: CI, RV, LV, RV/LV+S

N = kontrolní skupina žijící v normoxii, **H** = skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10% O₂), již nebyl v průběhu hypoxické podáván ani jeden z inhibitoru NOS, **H + L-NAME 1. týden** = skupina, které byl v průběhu 1. týdne třítydenní hypoxické expozice podáván ve vodě na pití neselektivní inhibitor L-NAME v dávce (500mg/l), **H + L-NIL 1. týden** = skupina, které byl v průběhu 1. týdne třítydenní hypoxické expozice podáván ve vodě na pití selektivní inhibitor L-NIL v dávce 8mg/l.

CI= srdeční index, **RV** = hmotnost pravé komory srdeční, **LV** = hmotnost levé komory srdeční, **RV/LS + S** = poměr hmotností pravé srdeční komory a levé komory srdeční se septem.

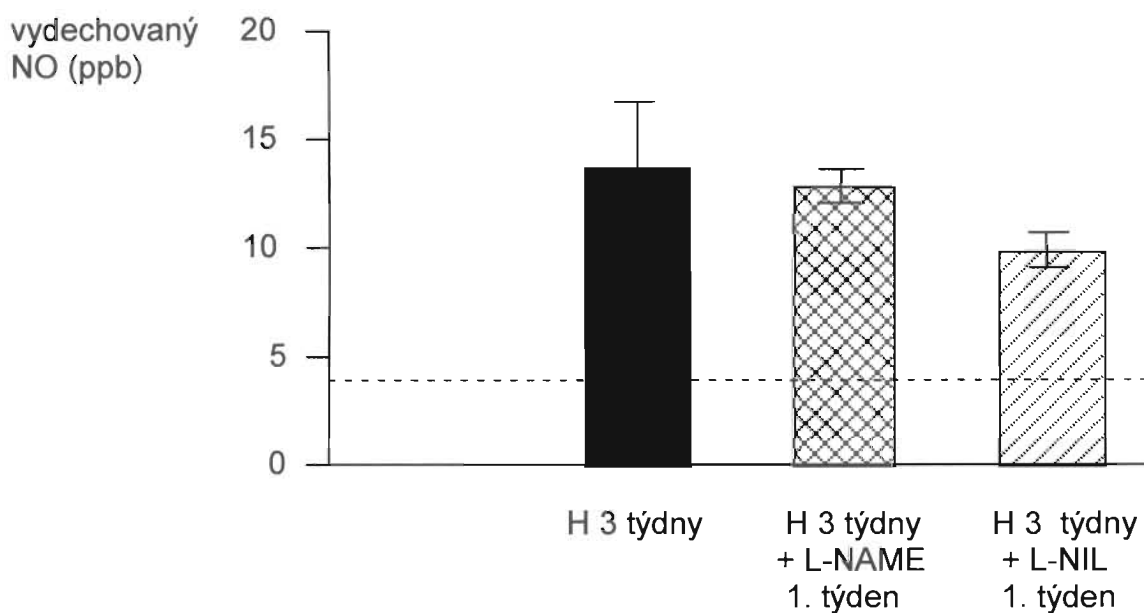
* p < 0.05 normoxická skupina N se významně liší od všech hypoxických skupin (H, H + L-NIL 1. týden, H + L-NAME 1. týden)

[†] p < 0.05 hypoxická skupina (H + L-NIL 1. týden) se významně liší od ostatních dvou hypoxických skupin (H + L-NIL 1. týden, H + L-NAME 1. týden)

p < 0.05 hypoxická skupina H + L-NIL 1. týden se významně liší od hypoxické skupiny H + L-NAME 1. týden

Koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu

Na konci hypoxické expozice byla koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu u všech zvířat, vystavených chronické hypoxii, zvýšená. Toto zvýšení bylo podobné u všech hypoxických skupin (obr.6).

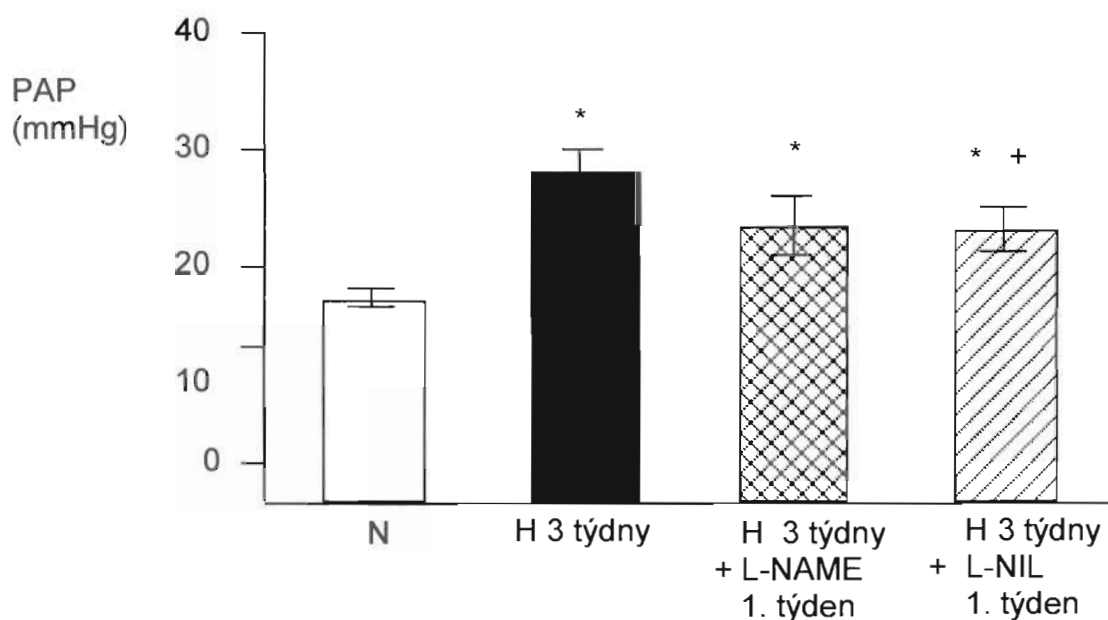


Obr. 6. 2 týdny po přerušení inhibice NOS nebyly signifikantní rozdíly v koncentraci NO ve vydechovaném vzduchu

N = kontrolní skupina žijící v normoxii, **H** = skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10% O₂), již nebyl v průběhu hypoxické podáván ani jeden z inhibitorů NOS, **H 3 týdny + L-NAME 1. týden** = skupina, které byl v průběhu 1. týdne třítýdenní hypoxické expozice podáván ve vodě na pití neselektivní inhibitor L-NAME v dávce (500mg/l), **H 3 týdny + L-NIL 1. týden** = skupina, které byl v průběhu 1. týdne třítýdenní hypoxické expozice podáván ve vodě na pití selektivní inhibitor L-NIL v dávce 8mg/l. Přerušovaná horizontálně vedená čára ukazuje hladinu vydechovaného NO u normoxických kontrol.

PAP- inhibice NOS v prvním týdnu 3-týdenní hypoxie redukuje PH

U všech zvířat, která byla vystavena 3-týdenní hypoxii, byl PAP signifikantně vyšší než u zvířat normoxických. Jak jsme očekávali, byl PAP po třech týdnech hypoxické expozice vyšší než po jednom týdnu expozice. Další rozdíly ve velikosti tlaku v a. pulmonalis byly mezi jednotlivými hypoxickými skupinami, a to v závislosti na tom, zda jim byl nebo nebyl podáván selektivní inhibitor NOS tj. L- NIL. Na konci 3. týdne hypoxické expozice byl PAP signifikantně nižší u potkanů, kterým byl podáván L-NIL na začátku hypoxické expozice (1. týden), než u těch, kterým nebyl podáván ani jeden z inhibitorů (obr. 7). Ačkoliv byly hodnoty PAP, ve skupině, která dostávala L-NAME velmi podobné hodnotám ve skupině, která dostávala L-NIL, PAP skupiny, která dostávala L-NAME, se ale překvapivě signifikantně nelišil od hypoxické skupiny, u které nebyla NO syntéza blokována. Příčinou je zřejmě nižší počet naměřených hodnot. Když jsme však hodnoty PAP obou skupin (L-NAME, L- NIL) spojili a srovnali se skupinou, které žádný z inhibitorů nebyl podán, zjistili jsme signifikantní rozdíl v PAP: skupina zvířat, které při hypoxické expozici nebyl podáván inhibitor NO syntézy, měla PAP signifikantně vyšší ($23 \pm 1,5$ vs. $28 \pm 1,7$ mmHg, $P = 0,026$).



Obr.7. Inhibice NOS v průběhu prvního týdne 3-týdenní hypoxie redukuje PH

N = kontrolní skupina žijící v normoxii, **H 3 týdny** = skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10% O₂), již nebyl v průběhu hypoxické podáván ani jeden z inhibitoru NOS, **H 3 týdny + L-NAME 1. týden** = skupina, které byl v průběhu 1. týdne třítýdenní hypoxické expozice podáván ve vodě na pití neselektivní inhibitor L-NAME v dávce (500mg/l), **H 3 týdny + L-NIL 1. týden** = skupina, které byl v průběhu 1. týdne třítýdenní hypoxické expozice podáván ve vodě na pití selektivní inhibitor L-NIL v dávce 8mg/l

* $p < 0.05$ všechny hypoxické skupiny (H 3 týdny, H 3 týdny + L-NAME 1. týden, H 3 týdny + L-NIL 1. týden) se signifikantně liší od normoxické skupiny N
 + $p < 0.05$ skupina H 3 týdny+L-NIL 1. týden se signifikantně liší od H 3 týdny
 Data jsou uváděná jako průměrné hodnoty \pm SEM.

4.1.4. Inhibice NOS v průběhu posledních 10 dnů 3-týdenní hypoxie

PROTOKOL POKUSU :

Tento experiment byl prováděn proto, abychom zjistili zda inhibice NOS v pozdější fázi hypoxické plicní hypertenze bude mít účinek podobný tomu, jaký jsme viděli u inhibice NOS na začátku HPH. Potkani byli po dobu tří týdnů vystaveni účinkům chronické hypoxie (10 % O₂), jak je opakovaně popsáno výše. V posledních deseti dnech jim byly obvyklým způsobem podávány L-NAME (500mg/l) nebo L-NIL (8mg/l). Další skupina potkanů byla rovněž exponována hypoxii, ale ani jeden z inhibitorů tímto potkanům podáván nebyl.

POROVNÁVALI JSME TYTO 3 SKUPINY:

Skupina H = skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10% O₂), již nebyl v průběhu hypoxické expozice podáván ani jeden z inhibitoru NOS, (n=8).

Skupina H 3 týdny + L-NAME 3. týden = skupina, které byl v průběhu 3.týdne hypoxické expozice podáván ve vodě na pití neselektivní inhibitor – L-NAME v dávce (500mg/l), (n=8).

Skupina H 3 týdny + L-NIL 3. týden = skupina, které byl v průběhu 3.týdne hypoxické expozice podáván ve vodě na pití selektivní inhibitor – L-NIL v dávce 8mg/l, (n=8).

Měření jednotlivých hemodynamických parametrů (CO,CI, SAP, PAP) a koncentrace NO bylo provedeno stejným způsobem jako v předchozích experimentech.

VÝSLEDKY:

Koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu

Před zahájením aplikace inhibitorů NOS (L-NAME, L-NIL) tj. před začátkem 3. týdne hypoxické expozice byla koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu zvýšená u všech hypoxických skupin stejně. Na konci inhibice NO syntézy tj. na konci 3. týdne hypoxické expozice byla koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu signifikantně snížena u skupin, kterým byly inhibitory NOS (L-NAME i L-NIL) podávány v průběhu třetího týdne expozice hypoxií (*obr. 8*).

Systémový arteriální tlak

SAP byl podle očekávání jednotýdenní blokádou NOS pomocí neselektivního inhibitoru L-NAME zvýšen, zatímco podávání neselektivního blokátoru L-NIL nemělo na velikost SAP vliv.

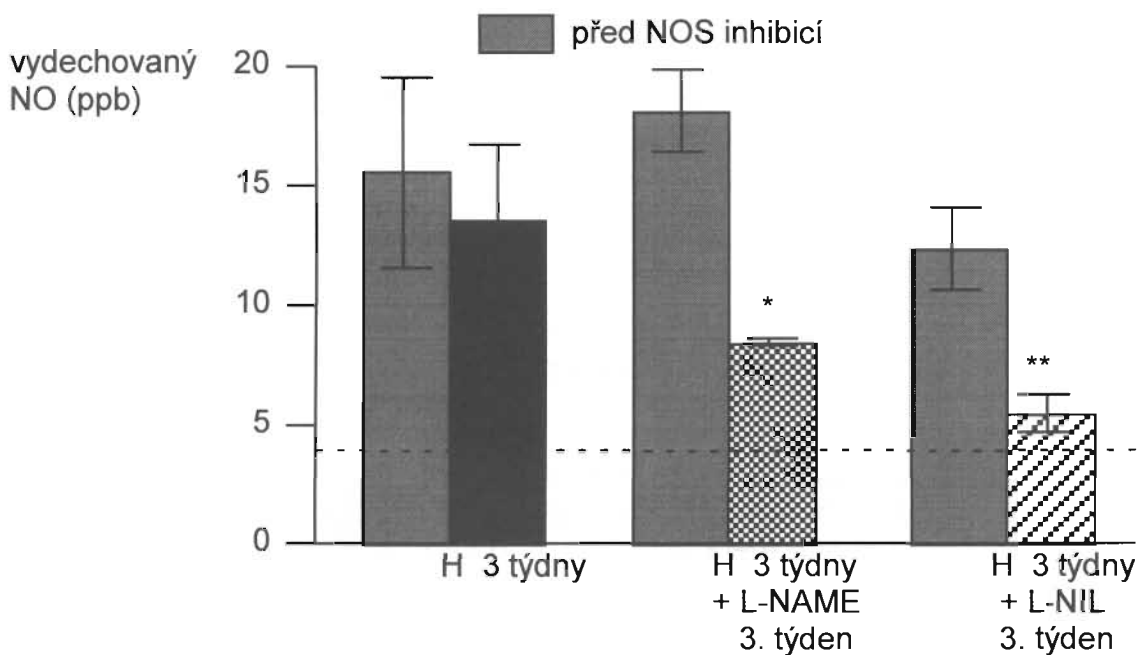
PAP- inhibice NOS v průběhu posledních 10 dnů 3-týdenní hypoxie nemá významný vliv na rozvoj HPH

PAP skupin, kterým byly podávány oba typy NOS inhibitorů ve třetím týdnu hypoxické expozice, se signifikantně nelišil od hypoxické skupiny, ve které nebyla NO syntéza blokována. Byla však zaznamenána tendence k nárůstu PAP ve skupině, které byl podáván L-NAME, a naopak tendence k poklesu PAP ve skupině, která dostávala L-NIL (*obr. 9*).

Hypertrofie pravé komory

Hmotnost pravé komory i RV/LV+S byly překvapivě nižší u skupiny, která dostávala L-NAME v průběhu posledního týdne třítydenní hypoxie, než u

zbylých dvou hypoxických skupin. Pro tento výsledek nemáme uspokojivé vysvětlení. Je možné, že se jedná o nespecifický účinek L-NAME (Archer and Hampf 1992). Jednotlivé hypoxické skupiny se navzájem nelišily v hmotnosti levé komory. Podání L-NIL neovlivnilo hmotnost levé komory.



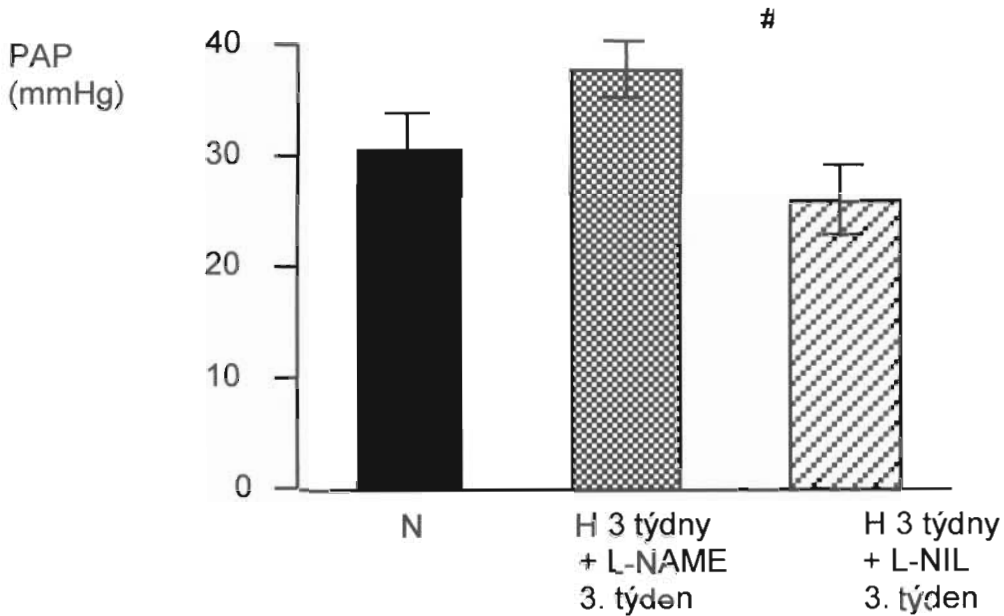
Obr.8. Koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu je podáváním inhibitorů NOS v posledních 10 dnech 3-týdenní hypoxie signifikantně snižena

N = kontrolní skupina žijící v normoxii, **H** = skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10% O₂), již nebyl v průběhu hypoxické podávání ani jeden z inhibitoru NOS, **H 3 týdny + L-NAME 3. týden** = skupina, které byl v průběhu 3. týdne hypoxické expozice podáván ve vodě na pití neselektivní inhibitor L-NAME v dávce (500mg/l), **H 3 týdny + L-NIL 3. týden** = skupina, které byl v průběhu 3. týdne hypoxické expozice podáván ve vodě na pití selektivní inhibitor L-NIL v dávce 8mg/l.

*p<0,05 signifikantní rozdíl vzhledem k hodnotám před inhibicí NOS

**p< 0.005 signifikantní rozdíl vzhledem k hodnotám před inhibicí NOS

Data jsou uváděná jako průměrné hodnoty ± SEM.



Obr. 9. Inhibice NOS ve 3. týdnu hypoxické expozice nemá výrazný vliv na rozvoj PH

N = kontrolní skupina žijící v normoxii, **H** = skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10% O₂), jíž nebyl v průběhu hypoxické podáván ani jeden z inhibitoru NOS, **H 3 týdny + L-NAME 3. týden** = skupina, které byl v průběhu 3. týdne hypoxické expozice podáván ve vodě na pití neselektivní inhibitor L-NAME v dávce (500mg/l), **H 3 týdny + L-NIL 3. týden** = skupina, které byl v průběhu 3. týdne hypoxické expozice podáván ve vodě na pití selektivní inhibitor L-NIL v dávce 8mg/l.

skupina H 3 týdny + L-NAME 3. týden se signifikantně liší od skupiny H 3 týdny + L-NIL 3. týden

Data jsou uváděná jako průměrné hodnoty ± SEM.

4.1.5. Exprese iNOS v plicních cévách na začátku chronické hypoxické expozice

PROTOKOL POKUSU :

Zvířata vystavená hypoxii po dobu 4 dnů (n=10) jsme porovnávali se zvířaty vystavenými hypoxii po dobu 20- ti dnů (n=8) a se zvířaty, která žila v normoxických podmínkách (n= 9).

Po uplynutí hypoxické expozice byla zvířata usmrcená přerušením krčního oddílu míchy v hluboké chloralhydratové anestezii (300 mg/ kg t. hm., Tarda , Olomouc, Česká republika). Poté byla levá plíce vyjmutá a celá fixovaná Bakersovým roztokem. Posléze byla tkáň levé plíce zalitá do parafinu a byly připraveny řezy o tloušťce 4-6 μm , ty pak byly barveny hematoxylinem-eozinem, toluidinovou modří, kresylovou modří, aldehyd fuchsinem. Pomocí monoklonálních protilátek anti-iNOS jsme detekovali expresi této izoformy v jednotlivých úsecích plicního arteriálního řečiště, v pleuře a dýchacích cestách. V této části experimentu jsme spolupracovali s doc. MVDr. Luděkem Vajnerem, CSc., vedoucím Ústavu histologie a embryologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

VÝSLEDKY :

Hypoxie působí přechodný nárůst exprese iNOS v plicních cévách na začátku chronické expozice

V plicích, izolovaných z potkanů žijících v normoxických podmínkách, nebyla detekována exprese iNOS. Naproti tomu po 4 dnech hypoxické expozice byla i NOS detekována ve všech plicních artériích všech průměrů. Maximum výskytu iNOS byla ve svalové vrstvě artérií. Navíc byla iNOS detekována v pleuře,

ve stěně dýchacích cest a ložiskově též v intraalveolárních septech. V pleuře a dýchacích cestách byla iNOS detekována též u zvířat vystavených hypoxii po dobu tří týdnů. Expresce iNOS ve stěně plicních cév byla přechodná. Po třetím týdnu hypoxické expozice byla expresce iNOS ve stěně plicních cév minimální.

4.1.6. Změny koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu v průběhu expozice chronické hypoxii

PROTOKOL POKUSU:

Chronická hypoxie je spojena se zvýšenou produkcí NO v plicní cirkulaci (Hampl and Herget 2000). Nicméně není jasné, zda se tento nárůst objevuje zakrátko po zahájení hypoxické expozice může tedy přispívat k oxidačnímu poškození v začátcích plicní cévní remodelace.

Koncentrace NO byla měřená obden v průběhu 26-ti denní hypoxické expozice (10%O₂) a v následujících 4 dnech po návratu zvířat na vzduch. Koncentrace NO byla měřená po 15-ti minutové akumulaci vydechovaného vzduchu ve vzduchotěsné nádobě u bdělých zvířat (kap. 3.4.2.b). Pro odlišení podílu horních dýchacích cest a plicní tkáně k nárůstu vydechovaného NO byl proveden doplňkový experiment.

U skupiny zvířat, která žila v normoxických podmínkách a skupiny, která byla 4 dny vystavená hypoxii (10%O₂) byla koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu měřená nejdříve po 10 minutové akumulaci vydechovaného vzduchu ve vzduchotěsné nádobě (viz kap. 3.4.2. b). Protože je známo, že produkce NO paranasálními a nasálními dutinami je značná (Dillon, Hampl et al. 1996), předpokládali jsme, že NO bude z těchto oddílů difundovat do vzduchotěsné

nádoby i přes nepřítomnost nasální ventilace. Podíl plicní tkáně a dolních dýchacích cest na vydechovaném NO byl určen po měření koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu po „vyřazení“ horních dýchacích cest z ventilace. Zvířatům z tohoto důvodu byla provedena tracheostomie a vydechovaný vzduch byl zachycován do upraveného kondomu připojeného k tracheostomické kanyle (kap. 3.4.2.a.).

VÝSLEDKY:

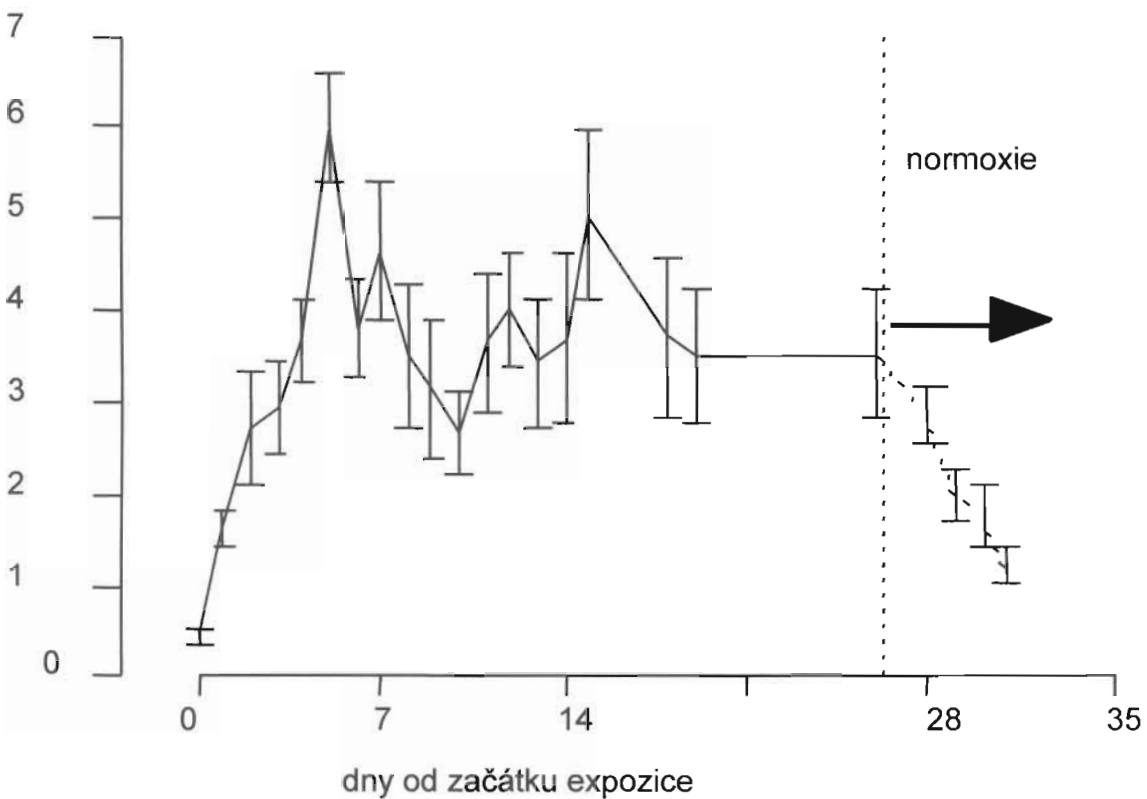
Koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu byla zvýšená na začátku expozice chronické hypoxii

U zvířat žijících v normoxických podmínkách byla koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu nízká. V prvním dnu hypoxické expozice došlo k markantnímu nárůstu koncentrace NO. Koncentrace NO narůstala až do 5. dne hypoxie. Poté došlo k jejímu poklesu a po zbytek hypoxické expozice už zůstala koncentrace NO i přes denní a individuální variabilitu stabilní. Při návratu do normoxických podmínek hladina NO klesla v podstatě k výchozím hodnotám v průběhu 4 dnů (obr. 10).

Při měření koncentrace NO ve vzduchu vydechovaném přímo z tracheální kanyly byly po 4 dnech hypoxické expozice naměřeny 2 x větší hodnoty u hypoxických zvířat než u kontrol. Rozdíl mezi koncentrací NO ve vzduchu zachyceném z tracheální kanyly a ve vzduchu kumulovaném 15 minut ve vzduchotěsné nádobě při spontánní ventilaci odrážel koncentrací NO, kterou k vydechovanému NO přispěli horní dýchací cesty. Nenalezli jsme zde rozdíl mezi hypoxickými a normoxickými zvířaty. Z toho vyplývá, že zdrojem NO ve

vydechovaném vzduchu je periferní část dýchacích cest případně plicní cirkulace.

vydechovaný NO
(ppb)



Obr. 10. Koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu je zvýšená na začátku expozice chronické hypoxii

4.1.7. Koncentrace nitrotyrosinu v plicní tkáni po 4. dni hypoxické expozice

PROTOKOL POKUSU:

Pro podporu naší hypotézy, podle které NO vytvořený na začátku chronické hypoxie přispívá k tkáňovému poškození, byla pomocí ELISA metody měřena koncentrace markeru produkce peroxynitritu-3-nitrotyrosinu. Koncentrace 3-nitrotyrosinu byla stanovena v extraktu lyofilizované plicní tkáně normoxických a hypoxických (4 dny) potkanů.

VÝSLEDKY :

Koncentrace nitrotyrosinu v plicní tkáni byla zvýšená po 4. dni hypoxické expozice

Koncentrace nitrotyrosinu v extraktu plicní tkáně izolované z potkanů vystavených 4 denní hypoxii (1065 ± 96 nmol/g extraktu proteinu) byla signifikantně vyšší ($P 0,0023$) než v plicní tkáni potkanů žijících v normoxických podmínkách (791 ± 57 nmol/g). To prokazuje vyšší produkci peroxynitritu – produktu interakce NO a superoxidu (Beckman and Koppenol 1996).

ZÁVĚR :

1 / NO SE PODÍLÍ NA ROZVOJI HPH NA ZAČÁTKU EXPOZICE CH

2 / ZDROJEM NO NA ZAČÁTKU ROZVOJE HYPOXICKÉ PLICNÍ HYPERTENZE JE INOS

4.2. INHIBICE DEGRANULACE ŽÍRNÝCH BUNĚK NA ZAČÁTKU EXPOZICE CHRONICKÉ HYPOXII

(PŘÍLOHA B)

PROTOKOL POKUSU:

V této studii jsme testovali hypotézu, podle které bude podávání kromoglykátu – látky, která brání degranulaci žírných buněk a tím pádem i uvolnění MMP, na začátku expozice CH, redukovat HPH.

Tři skupiny laboratorních potkanů byly po dobu 3 týdnů vystaveny chronické hypoxii (10 O₂%). Zvířatům ze dvou hypoxických skupin byl podáván kromoglykát sodný (Sigma Aldrich, 40 mg/kg tělesné hmotnosti, intraperitoneálně). Jedné skupině byl kromoglykát podáván v prvních 4 dnech expozice hypoxii, tato skupina byla označena jako DSCG+H. Potkanům druhé hypoxické skupiny byl kromoglykát podáván až na konci hypoxické expozice, konkrétně poslední 4 dny expozice. Tato skupina byla označena jako H+ DSCG. Potkanům v třetí hypoxické skupině nebyl kromoglykát podáván vůbec, a skupina byla označena jako H. Čtvrtá skupina zvířat žila po celou dobu v normoxii a zvířatům této skupiny kromoglykát rovněž nebyl podáván, byla označena jako N .

TESTOVALI JSME TYTO 4 SKUPINY ZVÍŘAT

Skupina H+ DSCG - skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10% O₂) již byl kromoglykát podáván na konci hypoxické expozice, (n=8).

Skupina DSCG+H - skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10% O₂) již byl kromoglykát podáván v prvních 4 dnech expozice hypoxii, (n=13).

Skupina H - skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10% O₂), již nebyl v průběhu hypoxické expozice podáván kromoglykát, (n=13).

Skupina N - skupina žijící v normoxii, již nebyl podáván kromoglykát (n=13).

Po třech týdnech chronické hypoxie byly všem zvířatům měřeny SAP, PAP, CO. Po změření hemodynamických parametrů byla zvířata uvedena do hluboké anestezie (thiopental 40mg/kg) a byly jim odejmuty srdce a plíce. Poté byla pravá komora srdeční oddělena od levé se septem a tyto oddíly byly zváženy. Míru hypertrofie pravé komory určil poměr hmotností pravé komory a levé komory se septem. Plíce byly naplněny neutrálním formolem infundovaným tracheou (20cm H₂O) a poté byly ve formolu uchovány 4 týdny. Jednotlivé řezy plicní tkáně byly obarveny hematoxilinem, resorcinem a fuchsinem a bylo odečteno % dvojité laminované periferních plicních cév, jak je popsáno v kapitole 3.5.2.

V doplňujícím experimentu jsme 5 potkanů ze skupin (N, H, DSCG) po 4 dnech hypoxické expozice uvedli do celkové anestezie a po usmrcení (přetětím břišní části aorty a vykrvením) jim byly vyjmuty plíce. Z plicní tkáně byly izolovány plicní artérie 3. a 4. řádu. Tyto artérie byly naštěpeny pepsinem a supernatant s kolagénem byl analyzován pomocí SDS- PAGE elektroforézy. Doba 4 dnů byla určena na základě výsledku našich předchozích studií.

Výsledky těchto studií potvrdily signifikantně vyšší množství nízkomolekulárních štěpů právě v prvních dnech expozice chronické hypoxii.

VÝSLEDKY :

Tělesná hmotnost

Na začátku experimentu se zvířata jednotlivých skupin významně nelišila tělesnou hmotností. Na konci experimentu měli potkani, kteří byli vystaveni chronické hypoxii, signifikantně nižší hmotnost než potkani žijící v normoxických podmínkách (tab. 3).

Skupina	BW (g)	CO (ml/min)	SAP (mmHg)	RV/LV+S
N	425 ± 8	# 61 ± 3	# 114 ± 4	0,245 ± 0,006
H	337 ± 5 *	# 37 ± 3 *	112 ± 4	0,541 ± 0,033 *
DSCG+H (časně)	329 ± 2 *	## 38 ± 3 *	111 ± 5	0,467 ± 0,028 * +
H+DSCG (pozdně)	349 ± 7 *	35 ± 2 *	118 ± 4	0,470 ± 0,020 * +

Tab. 3: Hemodynamické parametry (CO, SAP, RV/LV+S)

N = kontrolní skupina žijící v normoxii, **H** = skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10 % O₂), již nebyl v době expozice podáván kromoglykát,

DSCG + H = hypoxická skupina, které byl kromoglykát podáván v průběhu prvních 4 dnů expozice 3-týdenní hypoxii hypoxii,

H+DSCG = hypoxická skupina, které byl kromoglykát podáván v průběhu posledních 4 dnů expozice 3-týdenní hypoxii

CO = srdeční výdej, **SAP** = střední systémový arteriální tlak, **RV/LV+S** = poměr hmotností pravé srdeční komory a levé srdeční komory se septem

*p < 0,001 hypoxická skupina se statisticky významně liší od skupiny normoxické

+ p < 0,05 hypoxické skupiny s časnou a pozdní aplikací kromoglykátu se liší od hypoxické skupiny, které kromoglykát nebyl podáván

data od 7 zvířat, ## data od 6 zvířat

PAP- podávání kromoglykátu v průběhu prvních 4 dnů chronické hypoxie signifikantně redukuje PH

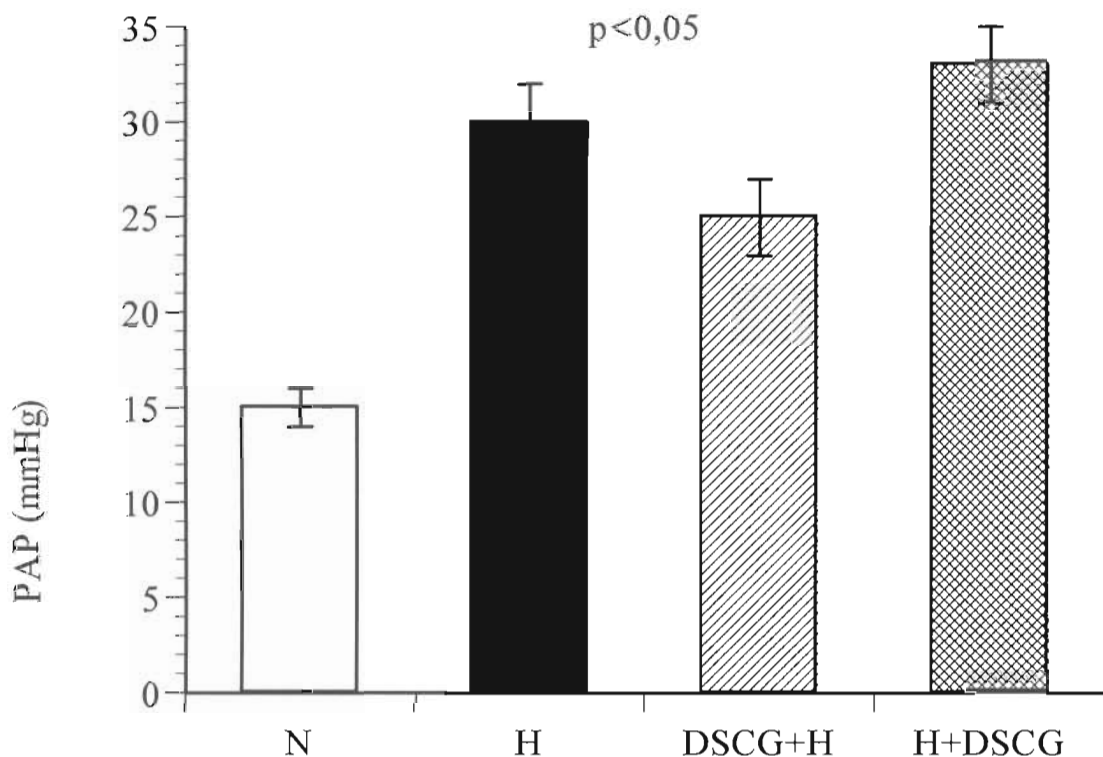
Všechna zvířata vystavená hypoxii měla významně vyšší PAP ($p < 0,0001$) než zvířata normoxická. Avšak u zvířat, kterým byl podáván kromoglykát v prvních čtyřech dnech hypoxické expozice, byl tlak v plicnici významně nižší ($p < 0,05$) než u zbylých dvou hypoxických skupin (*obr. 11*).

Systémový arteriální tlak

Expozice chronické hypoxii ani podávání kromoglykátu neovlivnily systémový arteriální tlak.

Srdeční výdej

Srdeční výdej byl signifikantně nižší u všech hypoxických zvířat ($p < 0,0001$) v porovnání se zvířaty žijícími v normoxických podmínkách. Mezi jednotlivými hypoxickými skupinami nebyl zaznamenán výrazný rozdíl v srdečním výdeji.



Obř. 11. Podávání kromoglykátu v průběhu prvních 4 dnů chronické hypoxie signifikantně redukuje PAP na konci 3. týdne hypoxické expozice

N = kontrolní skupina žijící v normoxii, **H** = skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10 % O₂), již nebyl v době expozice podáván kromoglykát,

DSCG + H = hypoxická skupina, které byl kromoglykát podáván v průběhu prvních 4 dnů expozice 3-týdenní hypoxii,

H+DSCG = hypoxická skupina, které byl kromoglykát podáván v průběhu posledních 4 dnů expozice 3-týdenní hypoxii

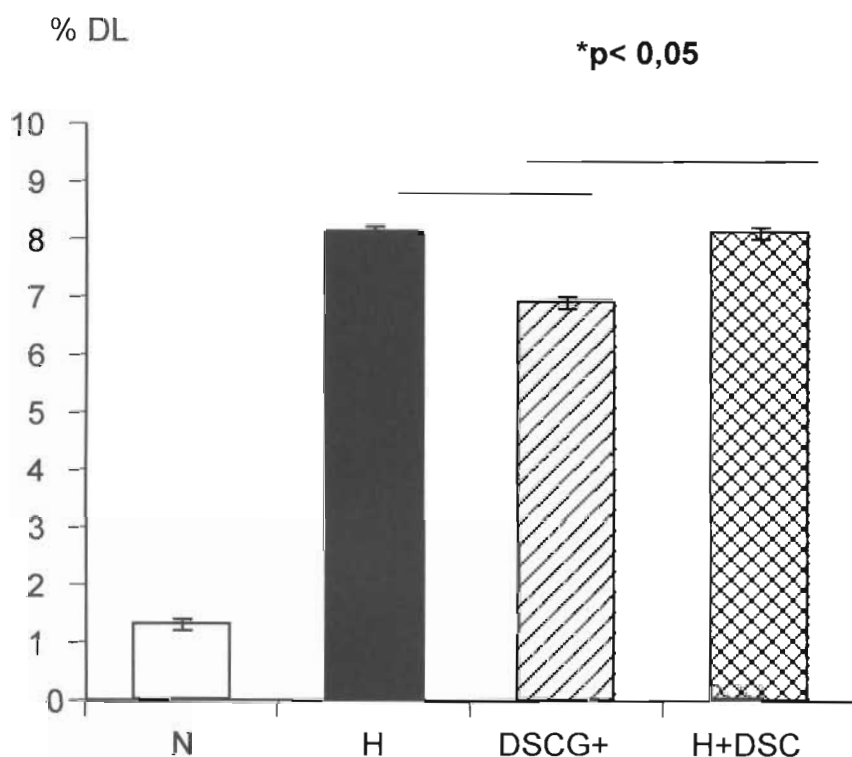
***p < 0,05** skupina **DSCG + H** se statisticky významně liší od zbylých dvou hypoxických skupin.

Data jsou uváděná jako průměrné hodnoty ± SEM.

Muskularizace periferních plicních cév

Aplikace kromoglykátu v časné fázi expozice hypoxii částečně snížila muskularizaci periferních plicních cév. Procento dvojité laminovaných periferních plicních cév (%DL) bylo signifikantně nižší ($p < 0,001$) u skupiny,

kteřá dostávala kromoglykát na začátku hypoxie (skupina DCSG+H) v porovnání s hypoxickou skupinou, které kromoglykát nebyl podán vůbec (skupina H) a také nižší ($p < 0,05$) v porovnání se skupinou, která dostávala kromoglykát až na konci hypoxické expozice (skupina H+DSCG) (obr. 12)



Obr. 12. Podávání kromoglykátu v průběhu prvních 4 dnů chronické hypoxie signifikantně redukuje procento dvojité laminované periferních plicních cév (%DL)

N = kontrolní skupina žijící v normoxii, **H** = skupina vystavená 3 týdny hypoxii (10 % O₂), již nebyl v době expozice podáván kromoglykát,

DSCG + H = hypoxická skupina, které byl kromoglykát podáván v průběhu prvních 4 dnů expozice 3-týdenní hypoxii,

H+DSCG = hypoxická skupina, které byl kromoglykát podáván v průběhu posledních 4 dnů expozice 3-týdenní hypoxii

* $p < 0,05$ skupina **DSCG + H** se statisticky významně liší od zbylých dvou hypoxických skupin.

Data jsou uváděna jako průměrné hodnoty \pm SEM.

Hypertrofie pravé komory srdeční

Poměr hmotností pravé komory k hmotnosti levé komory a septa (RV/LV+S) byl signifikantně nižší u zvířat, kterým byl během hypoxické expozice podáván kromoglykát než u zvířat kterým kromoglykát podáván nebyl. Překvapivě byl (RV/LV+S) signifikantní nižší nejen u skupiny, které byl kromoglykát podáván na začátku hypoxické expozice, ale též u skupiny, které byl kromoglykát podáván na konci hypoxické expozice ($p < 0,05$) (tab. 3).

ZÁVĚR:

- 1/ KROMOGLYKÁT PODÁVANÝ V ČASNÉ FÁZI HYPOXIE SIGNIFIKANTNĚ SNIŽUJE PH
- 2/ KROMOGLYKÁT PODÁVANÝ V POZDNÍ FÁZI HYPOXICKÉ EXPOZICE PH NEOVLIVNÍ

5. DISKUZE

5.1 INDUKCE iNOS SE PODÍLÍ NA ROZVOJI HPH

Tato studie prokázala, že nárůst produkce NO v plicích v průběhu prvních dnů chronické hypoxie se významnou měrou podílí na zahájení procesu, který v konečném důsledku vede ke vzniku HPH. Podstatná je přitom produkce izoformou iNOS. Inhibice NO syntézy v prvních dnech hypoxické expozice částečně bránila zvýšení tlaku v a. pulmonalis. V tomto ohledu byl selektivní inhibitor iNOS (L-NIL) stejně účinný jako neselektivní inhibitor (L-NAME).

U skupiny pokusných zvířat, která byla hypoxii vystavena další dva týdny, byl PAP trvale snížen, přestože L-NIL těmto zvířatům již nebyl dále podáván. Na druhé straně, ve fázi, kdy plicní hypertenze byla již rozvinutá, neměla inhibice NO syntézy vliv na PAP. Nález výrazné přechodné exprese iNOS v plicních cévách po 4 dnech hypoxické expozice také potvrdil účast iNOS na rozvoji HPH v prvních dnech hypoxie. Hodnoty NO ve vydechovaném vzduchu rovněž ukazují na zvýšenou produkci NO na začátku hypoxie.

NO je znám především díky svému vazodilatačnímu působení. Inhalačně je užíván při léčbě novorozeneckých plicně hypertenzních krizí. Na druhé straně je NO také radikál schopný přímo nebo po reakci s jinými reaktivními sloučeninami (peroxynitrit) poškozovat tkáně. Poškození stěny plicních cév reaktivními sloučeninami kyslíku na začátku expozice hypoxií iniciuje proces vaskulární remodelace, který nakonec vede ke vzniku plicní hypertenze (Igari, Tatsumi et al. 1998; Lachmanova, Hnilickova et al. 2005). Nález zvýšené

koncentrace nitrotyrosinu v plicní tkáni po 4 dnech hypoxické expozice podporuje naši hypotézu, podle které zvýšená produkce NO (prostřednictvím iNOS) v iniciální fázi expozice hypoxií přispívá k radikálovému poškození cévní stěny a k rozvoji plicní hypertenze. S tímto faktem koresponduje i zjištění, že koncentrace nitrotyrosinu v séru byla zvýšena po 4 dnech hypoxické expozice, ale ve třetím týdnu hypoxické expozice byla její hladina opět normální. Zvýšená hladina nitrotyrosinu v plicích byla nalezena i u pacientů s plicní hypertenzí (Bowers, Cool et al. 2004).

L-NIL v dávce 8mg/l aplikován ve vodě určené k napájení zvířat výrazně redukoval množství NO ve vydechaném vzduchu po stimulaci LPS, třebaže ne v takovém rozsahu jako neselektivní inhibitor L-NAME v dávce 500 mg/l. Tato skutečnost je v souladu s faktem, podle kterého LPS může indukovat nejenom expresi iNOS, ale také expresi nNOS a eNOS (Comtois, EL-Dwairi et al. 1999; Harada, Imaki et al. 1999; Iwase, Miyanaka et al. 2000). Poněkud překvapivé je zjištění, že ani vyšší dávka L-NAME nesnížila hladinu NO ve vydechaném vzduchu po stimulaci LPS pod hranici detekovatelnosti naším přístrojem. Je to vysvětlitelné tím, že určité množství NO je tvořeno strukturami mimo přímý dosah cirkulace. Např. makrofágy mohou být stimulovány k produkci NO po kontaktu s LPS v krevním oběhu, poté však cirkulaci opustí a osídlí alveolární prostory, kde může být penetrace L-NAME limitována.

Redukce PAP při inhibici NOS v průběhu prvního týdne expozice hypoxií nebyla spojena se snížením hypertrofie pravé komory. Hypertrofie pravé komory je důsledkem jejího tlakového přetížení při chronickém zvýšení tlaku v plicnici. Nicméně mnoho studií naznačilo, že při plicní hypertenzi nemusí být hypertrofie

pravé komory vždy přítomná. Je také známo, že v některých experimentech, kdy byl snížen PAP, byla redukce hypertrofie pravé komory mnohem menší (Underwood, Bochnowicz et al. 1998; Tyler, Muramatsu et al. 1999). Chronická plicní hypertenze může být experimentálně vyvolána i bez přítomnosti hypertrofie pravé komory (Chen, Chen et al. 1999).

Nárůst hmotnosti pravé komory proporcionálně k nárůstu PAP byl zaznamenán u mláďat potkanů vystavených intermitentní hypoxii od 4. dne věku, ale podobná signifikantní korelace nebyla nalezena u starších zvířat (Kolar, Ostadal et al. 1989). Je docela pravděpodobné, že chronická hypoxie může mít i přímý účinek na hypertrofii komory, nejen sekundárně prostřednictvím vzestupu PAP. Tato možnost je podpořena pozorováním, kdy při chronické hypoxii vznikla též hypertrofie levé komory srdeční (Kolar, Ostadal et al. 1989).

Účinek inhibice NO syntézy na rozvoj HPH byl předmětem mnoha studií. Ty ale nebyly specificky zaměřené na iniciační stádium expozice chronické hypoxii. Mnoho z nich prokázalo, že akutní aplikace neselektivních inhibitorů NOS vyvolá podstatně větší vazokonstrikci v plicích chronicky hypoxických potkanů v porovnání s potkany žijícími v normoxii. Naproti tomu potkani, kterým byl v průběhu 3-týdenní hypoxické expozice podáván L-NAME, neměli větší plicní hypertenzi než potkani vystavení stejnému stupni hypoxie, ale bez aplikace NOS inhibitorů (Hampl, Archer et al. 1993). Výsledky naší studie nabízejí jedno možné vysvětlení tohoto paradoxu. Jedná se zřejmě o kombinaci trvalé redukce plicní hypertenze prostřednictvím inhibice iNOS v prvním týdnu chronické expozice a zároveň protichůdně působícího nárůstu plicní

hypertenze v pozdějších fázích hypoxické expozice, kdy je omezen účinek eNOS.

Existují studie, které ukázaly, že podávání selektivního inhibitoru iNOS po celou dobu expozice chronické hypoxii (3-4 týdny) nemá vliv na rozvoj plicní hypertenze (Resta, O'Donoghuy et al. 1999; Tyler, Muramatsu et al. 1999). V naší studii podávání inhibitoru iNOS působilo redukcí plicní hypertenze. Tuto diskrepanci může vysvětlit fakt, že naše pracovní skupina zahájila podávání inhibitoru iNOS již 3 dny před expozicí hypoxii, abychom měli na začátku expozice efektivní hladinu tohoto inhibitoru v krvi a ve tkáních. Tedy role iNOS v remodelaci plicních cév v se vztahuje k začátku expozice hypoxii.

V naší studii je poprvé popsáno chronické perorální použití L-NIL pro selektivní inhibici iNOS in vivo. Byli již popsány metody, kdy byl L-NIL aplikován kontinuální infuzí nebo opakovanými injekcemi (Schwartz, Mendonca et al. 1997; Resta, O'Donoghuy et al. 1999). Naše metoda aplikace ve vodě k napájení je praktická. Nevýhodou může být rozdílný příjem tekutiny jednotlivými zvířaty na začátku expozice hypoxií. Pro toto období je totiž charakteristický snížený příjem tekutiny. Nicméně v naší studii byl příjem L-NIL v prvním týdnu expozice dostatečný. To dokazuje měření koncentrace vydechovaného NO. U hypoxických zvířat, kterým byl podáván L-NIL byla koncentrace vydechovaného NO velmi podobná koncentraci, jakou měla zvířata žijící v té době v normoxii. Tudíž inhibice iNOS tímto způsobem aplikace jejího inhibitoru byla účinná.

Mnoho autorů prokázalo při expozici chronické hypoxii zvýšenou hladinu mRNA pro NOS a dokonce i zvýšenou hladinu samotného proteinu NOS (viz

review (Hampl and Herget 2000). Většina těchto studií se zaměřila na aktivitu eNOS anebo nespecifikovala jednotlivé subtypy NOS. Zároveň však existují studie, které prokázaly zvýšení mRNA iNOS nebo samotného enzymu na konci expozice chronické hypoxii v homogenátu celých plic (Le Cras, Xue et al. 1996; Igari, Tatsumi et al. 1998; Palmer, Semenza et al. 1998; Resta, O'Donoghuy et al. 1999; Fagan, Morrissey et al. 2001). Dvě práce popisují zvýšenou expresi iNOS v průběhu prvního týdne hypoxické expozice u potkanů. V obou případech jde ale o homogenát celých plic bez specifikace místa přesné exprese (Xue and Johns 1996; Teng, Li et al. 2002). Naše skupina doplnila tyto údaje dalšími výsledky, které prokázaly, že iNOS je exprimována v prvních dnech hypoxie hlavně v plicních cévách, a to především v jejich médiu. Navíc naše data ukazují, že při delším působení hypoxie přetrvává zvýšená exprese iNOS v epitelu dýchacích cest, ale v plicních cévách je již obtížně detekovatelná. Zdá se tedy, že při dlouhodobé expozici hypoxií je hladina proteinu iNOS v plicích celkově zvýšená (Igari, Tatsumi et al. 1998; Fagan, Morrissey et al. 2001), avšak tyto studie nemohou prokázat extravaskulární expresi iNOS (Fagan, Morrissey et al. 2001). Naše data potvrzují hypotézu, že exprese iNOS v plicních cévách stoupá v prvních dnech expozice hypoxií a poté se vrací k výchozím hodnotám.

Existují ojedinělé studie, které ukázaly, že zvýšená exprese iNOS nemusí být doprovázena zvýšenou produkcí NO (Lovchik, Lipscomb et al. 1997; Cadogan, Hopkins et al. 1999; Cucchiaro, Tatum et al. 1999). Tudíž pro potvrzení naší hypotézy o kauzálním nárůstu syntézy NO na začátku rozvoje HPH bylo nezbytné prokázat, že je v plicních cévách na začátku hypoxické expozice zvýšená nejenom exprese iNOS, ale také že skutečně narůstá v tomto období

i syntéza NO. O zvýšené tvorbě NO v průběhu chronické hypoxie obsažně pojednává přehled (Hampel and Herget 2000).

Obyvatelé vysokých nadmořských výšek vydechují větší množství NO v porovnání s lidmi žijícími v nižších polohách (Beall, Laskowski et al. 2001).

Protože je při pobytu ve vysoké nadmořské výšce dostupnost kyslíku, díky jeho nízkému parciálnímu tlaku ve vdechovaném vzduchu snižena, může zvýšení průtoku krve plicemi pomoci zlepšit dodávku O₂ do tkání. HPV je hlavním mechanismem, který reguluje průtok krve plicemi. V zájmu optimálního okysličení krve jsou přednostně perfundovány dobře ventilované alveoly a naopak v oblastech nedostatečně ventilovaných je průtok krve nižší. Tento mechanismus se uplatňuje v místech s normálním atmosférickým tlakem a týká se izolovaných okřsků plic, které jsou z různých příčin hůře ventilovány (West, Dollery et al. 1964). Protože ale ve vysoké nadmořské výšce jsou hypoxické všechny oblasti plic, výsledná povšechná vazokonstrikce nepůsobí redistribucí průtoku krve, nýbrž nárůstem plicního arteriálního tlaku. Při dlouhodobém pobytu ve vysoké nadmořské výšce vznikají pak v plicní cirkulaci kromě funkčních změn také již výše opakovaně popisované změny morfologické, které mají za následek zvýšení periferního plicního cévního odporu. Následkem dlouhodobého přetěžování pravé srdeční komory při zvýšeném periferním plicním odporu pak její hypertrofie (West, Dollery et al. 1964). Přesto mnoho lidí žijících ve vysoké nadmořské výšce nemá plicní hypertenzi ani hypertrofii pravé srdeční komory. Je tedy jasné, že existuje faktor, který se významnou měrou podílí na regulaci průtoku krve plicemi v hypoxii. Tímto faktorem je s velkou pravděpodobností NO, uplatňující se v tomto případě především jako vazodilatační agens. Zvýšená produkce NO v plicích představuje zřejmě

prostředek zmírňující vazokonstrikci, tím pádem zabraňuje také snížení průtoku krve plicemi a nakonec i přívod kyslíku do tkání. Takto je možné vysvětlit vyšší produkci NO v plicích u Tibeťanů a jiných národů žijících ve vysokých horách.

Nicméně změny produkce NO v průběhu prvních dnů hypoxické expozice zatím nebyly zkoumány. Ukázali jsme nárůst koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu už od prvního dne expozice chronické hypoxii (*obr. 10*). Ačkoliv je toto měření proveditelné relativně jednoduše, jeho limitací je nejasnost původu vydechovaného NO. Nejsme totiž schopni tímto způsobem lokalizovat topický zdroj vydechovaného NO. Významným zdrojem vydechovaného NO jsou horní dýchací cesty; hlavně nasální a paranasální dutiny (Lundberg, Farkas-Szallasi et al. 1995; Dillon, Hampl et al. 1996). Provedli jsme proto další experiment, ve kterém jsme prokázali, že za vzestup vydechovaného NO v prvních dnech expozice chronické hypoxii je odpovědný oddíl respiračního traktu pod úrovní trachey.

V normoxii je NO generovaný izoformou eNOS (Vaughan, Brogan et al. 2003). Protože pomocí L-NIL anebo L-NAME byla koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu hypoxických zvířat zredukována na úroveň vydechovaného NO zvířat žijících v normoxii je možno maximum vydechovaného NO přičíst aktivitě iNOS (*obr. 4*). Měření koncentrace NO ve vzduchu akumulovaném ve vzduchotěsné nádobě je nenáročnou metodou pro stanovení produkce NO u bdělých zvířat. Ačkoliv jsme jako zdroj NO označili plíce, je možné, že takto naměřený NO může pocházet také z kolon (činností bakterií) nebo ze žaludku. Protože ale hypoxií indukovaný vzestup vydechovaného NO byl kompletně inhibován aplikací L-NIL nebo L-NAME, předpokládáme, že jeho zdrojem je plicní tkáň.

Třebaže naše výsledky prokázaly, že iNOS je důležitou součástí iniciální fáze rozvoje HPH, neobjasnili jsme, zda zvýšená exprese iNOS na začátku expozice CH je příčinou nebo důsledkem poškození stěny plicních cév, které je příčinou jejich remodelace. Je možné, že má NO v iniciální fázi HPH převážně škodlivý účinek. Proto zřejmě inhalace NO, u ARDS (Kaisers, Busch et al. 2003) a u perzistující plicní hypertenze novorozenců (Kinsella, Walsh et al. 1999; Clark, Kueser et al. 2000) nezlepšuje dlouhodobě výsledky těchto stavů.

5.2 INHIBICE DEGRANULACE ŽÍRNÝCH BUNĚK NA ZAČÁTKU EXPOZICE CHRONICKÉ HYPOXII TLUMÍ ROZVOJ PH

Inhibice degranulace žírných buněk podáváním kromoglykátu v prvních 4 dnech expozice chronické hypoxii významně snížila PAP. Předpokládáme, že kromoglykát tlumí rozvoj HPH především tím, že zabrání uvolnění MMP. Inhibice degranulace žírných buněk totiž zároveň brání akumulaci nízkomolekulárních štěpů kolagenu v periferní části plicního řečiště. Tento nálezný je v souladu s nálezy Novotné a Hergeta, kteří zjistili, že farmakologická inhibice kolagenolytické aktivity MMP bránila rozvoji HPH a omezila výskyt nízkomolekulárních kolagenních fragmentů ve stěně periferních plicních artérií (Herget, Novotna et al. 2003).

Důležité je rovněž zjištění, že kromoglykát tlumí rozvoj HPH, jenom pokud je podáván na počátku expozice hypoxii. Jeho podávání v pozdějších fázích již

HPH neovlivní. To podporuje naši hypotézu, podle které jsou první dny hypoxické expozice rozhodující pro rozvoj HPH.

Jak bylo diskutováno výše, první týden hypoxické expozice je charakterizován poškozením plicní tkáně vlivem radikálů (Herget, Wilhelm et al. 2000; Wilhelm, Vankova et al. 2003; Lachmanova, Hnilickova et al. 2005). Vajner a kol. popsali změny distribuce žírných buněk exprimujících MMP – 13 v plicích zvířat vystavených 4 a 20 denní hypoxii. U zvířat, vystavených 4 denní hypoxii, tyto buňky výrazně převládají v adventicii prealveolárních arteriol (Vajner, Vytasek et al. 2006), u zvířat vystavených hypoxii po dobu 3 týdnů z této oblasti mizí a nacházejí se v oblasti cév vodivých (Vajner, Vytasek et al. 2006). Rabinovitch a kol. již v roce 1979 prokázali, že hypoxická vaskulární remodelace začíná v prvním týdnu expozice hypoxii (Rabinovitch, Gamble et al. 1979). Domníváme se, že remodelace periferních plicních cév je zahájena aktivací intersticiální kolagenázy MMP-13, která štěpí kolagen na 1/4 a 3/4 fragmenty. Fragmenty této velikosti jsou typicky přítomny v periferních plicních artériích hypoxických zvířat (Novotna, Bibova et al. 2001) a mohou stimulovat metabolismus kolagenu v plicní tkáni (Gardi, Calzoni et al. 1994).

Zjistili jsme, že podávání kromoglykátu, byť jenom v častém úseku chronické expozice-(ať už na jejím začátku nebo konci)-signifikantně snižuje hypoxii-indukovanou hypertrofii pravé komory. Stejně výsledky získali i jiní autoři, kteří inhibovali degranulaci žírných buněk pomocí kromoglykátu po celou dobu hypoxické expozice (Kay, Suyama et al. 1981). V rozporu s tímto Mungall a kol. nezaznamenali protektivní účinek kromoglykátu na hypertrofii pravé komory u potkanů vystavených chronické hypoxii (Mungall 1976). Nicméně tato skupina použila ve svém experimentu 4-krát nižší dávku

kromoglykátu než my (10 mg/ kg i.v.). Zhu a spolupracovníci nezjistili rozdíly v PAP, v hypertrofii pravé komory, ani muskularizaci periferních plicních cév u intaktních myší a u myší s deficitním genem pro žírné buňky vystavených chronické hypoxii (Zhu, Kradin et al. 1983). Na rozdíl od naší skupiny (Vajner, Vytasek et al. 2006). Zhu a kol. nepozorovali odlišnou distribuci žírných buněk vlivem hypoxie ani u intaktních myší. Toto je možné vysvětlit tím, že množství žírných buněk je v plicích normálních myší v porovnání s potkany zanedbatelné. Tucker a kol. pozorovali širokou variabilitu v počtu plicních žírných buněk mezi jednotlivými zvířecími druhy (Tucker, McMurtry et al. 1977). Počet žírných buněk koreluje pravděpodobně se závažností plicní hypertenze.

Kromoglykát zabraňuje vyplavení jak mediátorů preformovaných (např. histaminu, kininů) tak i mediátorů, které jsou syntetizovány až po stimulaci prostaglandiny či leukotrieny a působí tak jako protizánětlivý činitel (Matsuo, Shimoda et al. 2000). V klinické praxi je kromoglykát používán většinou k potlačení lokálních alergických projevů nebo systémově při léčbě mastocytozy. Působí pravděpodobně prostřednictvím fosforylace 78 KDa proteinu moesinu, který působí přeskupení membránového cytoskeletu a obklopuje sekreční granula (Theoharides, Wang et al. 2000). Tímto mechanismem může tedy zabránit vylití všech mediátorů včetně růstových faktorů, chemotaktických faktorů a proteáz. Steiner a kol. prokázali, že blokáda degranulace žírných buněk významně inhibovala mikrovaskulární zánětlivou reakci na systémovou hypoxii (Steiner, Gonzalez et al. 2003). V systémových cévách hypoxie zvyšuje produkci ROS, stimuluje adhezi a migraci leukocytů a zvyšuje permeabilitu cév. Všechny tyto mechanismy jsou zahrnuty v patogenezi HPH (Hampl and Hergert 2000).

Poměr hmotností pravé komory k hmotnosti levé komory a septa byl nižší u potkanů, kterým byl kromoglykát podáván na začátku hypoxické expozice a překvapivě i u potkanů, kterým byl podáván až na konci expozice. Vysvětlení spočívá v odlišném účinku kromoglykátu na plicní a srdeční tkáň. Brower a kol. preventivním podáním kromoglykátu zabránili nárůstu počtu žírných buněk a aktivity metaloproteináz v srdci potkanů s aortokavální fistulí (Brower, Chancey et al. 2002). Zdá se proto, že kromoglykát může mít přímý účinek na srdce. Zmnožení žírných buněk v okolí periferních plicních cév se vztahuje pouze na počáteční období expozice hypoxii (cca 1. týden). Po 3 týdnech hypoxické expozice je počet žírných buněk v této oblasti srovnatelný s počtem žírných buněk v okolí prealveolárních plicních cév zvířat žijících v normoxii (Vajner, Vytasek et al. 2006). To vysvětluje proč podávání kromoglykátu na konci 3-týdenní hypoxické expozice neovlivní plicní vaskulární remodelaci a cévní rezistenci. Na rozdíl od toho Rakusan a kol. demonstrovali trvalé zmnožení žírných buněk v srdci potkanů v průběhu celého období hypoxie (4 týdny) (Rakusan, Sarkar et al. 1990). Zajímavým nálezem této studie je, že v srdci potkanů s hypertenzí renálního původu nebyly žírné buňky zmnoženy. Z toho vyplývá, že zmnožení žírných buněk v srdečním svalu nesouvisí s tlakovou zátěží srdce.

5. 3. OBECNÁ DISKUSE ZÁVĚRŮ

Podle naší hypotézy souvisí patogeneze změn plicní cévní struktury při HPH s tvorbou ROS v plicní tkáni při chronické hypoxii. Proces remodelace plicní vaskulatury je zahájen štěpením vláken extracelulární matrix. Rozhodující postavení v metabolismu extracelulární matrix mají proteolytické metaloproteinázy. Předpokládáme, že ROS stimulují vaskulární remodelaci tím, že aktivují tyto kolagenolytické enzymy.

Zvýšená kolagenolytická aktivita má za následek uvolnění nízkomolekulárních štěpů kolagenu, které se akumulují v médiu a v adventicii stěny periferních artérií. Tyto fragmenty, které pak dále stimulují vlastní metabolismus kolagenu (Gardi, Calzoni et al. 1994) aktivují navíc proliferaci mesenchymových buněk ve stěně plicních cév (Bacakova, Lisa et al. 2002). Výsledkem této kaskády je nárůst periferního plicního cévního odporu a v konečném důsledku zvýšení plicního arteriálního tlaku.

Analýzou extraktů periferních plicních cév potkanů vystavených chronické hypoxii se zjistilo, že pokud byl potkanům v průběhu chronické hypoxie podáván antioxidant N- acetylcystein, nebyly v těchto extraktech nalezeny typické nízkomolekulární štěpy kolagenu (Herget, Novotna et al. 1999). V cévách potkanů, kterým v průběhu chronické hypoxie antioxidant podáván nebyl, byly tyto fragmenty přítomny ve významném množství. To potvrzuje význam zvýšené produkce ROS v patogenezi remodelace periferních plicních cév při HPH.

Charakter kolagenních štěpů (3/4 a 1/4 štěpy kolagenu typu I) svědčí o působení intersticiální kolagenázy, která patří do skupiny tkáňových metaloproteináz a je označována jako MMP13 (u hlodavců). Zvýšená aktivita MMP 13 při chronické hypoxii byla prokázána i přímo (Herget, Wilhelm et al. 2000).

Aktivace kolagenolýzy je jedním z důležitých patogenetických mechanismů cévní remodelace. Chronická hypoxie působí muskularizaci periferních plicních cév s následným zvýšením PAP vedoucím k hypertrofii pravé srdeční komory. Všechny tyto parametry byly u zvířat vystavených chronické hypoxii, kterým byl zároveň podáván specifický inhibitor MMP – batimastat, signifikantně sníženy (Herget, Novotna et al. 2003). Rovněž nízkomolekulární štěpy kolagenu v extraktu jejich periferních plicních cév nebyli přítomny (Herget, Novotna et al. 2003).

Regulace tvorby a uvolňování metaloproteináz je dosud nejasná. Jejich významným zdrojem jsou aktivované žírné buňky (Tozzi, Thakker-Varia et al. 1998). Je známo, že metaloproteinázy jsou syntenzovány a skladovány v sekrečních granulech ve formě neaktivních proenzymů. Jejich přeměna v aktivní enzymy může nastat působením serinových proteáz produkovaných přímo v žírných buňkách (Welle 1997). Dalšími látkami, které mohou aktivovat tkáňové metaloproteinázy jsou volné kyslíkové radikály, NO a jejich společné produkty, jejichž tvorba při hypoxii stoupá (Rajagopalan, Meng et al. 1996; Wilhelm, Sojková et al. 1996; Johnson, Hodyc et al. 2007).

Podle naší hypotézy aktivace kolagenolýzy úzce souvisí se zvýšenou produkcí ROS a následným radikálovým poškozením cévní stěny na začátku hypoxické expozice. Ukázali jsme, že podání antioxidantu N- acetylcysteinu brání

hypoxií indukované aktivaci metaloproteináz in vitro (Maxova, Novotna et al. 2004). V in vivo studiích bylo prokázáno, že podání antioxidantů zabrání rozvoji rozvoji hypoxické plicní hypertenze (Lachmanova, Hnilickova et al. 2005).

Aktivace metaloproteináz působením ROS je možná několika cestami :

1. Aktivní místo MMP je redox sensitivní a reaguje tedy na změny koncentrace ROS (Rajagopalan, Meng et al. 1996).
2. Tkáňové inhibitory MMP mohou být fragmentovány a inaktivovány působením radikálů (Rathke-Hartlieb, Budde et al. 2000).
3. Samotné oxidační poškození extracelulární matrix stěn periferních plicních je stimulem aktivace metaloproteináz.

ROS navíc přímo působí oxidační změny vazivových proteinů (Monboisse and Borel 1992; Bacakova, Wilhelm et al. 1997). Takto pozměněné vazivové proteiny účinně stimulují proliferaci hladkých svalových buněk (Bacakova, Wilhelm et al. 1997). Je pravděpodobné, že se mění adheze mesenchymových buněk k pojivové matrix (Bacakova, Lisa et al. 2002). Peroxidací lipidů buněčných membrán mohou ROS působit změny funkce mesenchymových buněk a jejich membránových receptorů. Navíc ROS zasahují i do metabolismu buněčné DNA a mohou tak ovlivňovat enzymatické reakce v cytosolu buněk.

Chronická hypoxie je spojena se vzestupem NO produkce v plicích (Hampl and Herget 2000). Xue a kol. demonstrovali zvýšenou expressi NOS v plicích chronicky hypoxických potkanů současně s charakteristickými

histologickými změnami doprovázejícími PH (Xue, Rengasamy et al. 1994). Toto zvýšení exprese zaznamenali na začátku rozvoje HPH (Xue and Johns 1996). Vyšší syntéza NO při chronické hypoxii vystavuje plicní tkáň nebezpečí oxidačního poškození, vznikajícího v důsledku radikálové povahy NO a zvláště jeho agresivního metabolitu peroxynitritu. Peroxynitrit vzniká reakcí NO a superoxidu, který je také syntetizován ve vyšší míře při tkáňovém poškození. Oxid dusnatý, superoxid a peroxynitrit jsou mocnými aktivátory metaloproteináz (Rajagopalan, Meng et al. 1996). Tímto způsobem se NO podílí na vzniku strukturálních vaskulárních změn v průběhu rozvoje HPH.

Dosavadní zjištění naší skupiny i jiných skupin zabývajících se studiem vzniku HPH ukazují, že morfologické, biochemické a hemodynamické změny charakteristické pro HPH jsou přítomny již v průběhu prvního týdne hypoxické expozice.

PROKÁZALI JSME, ŽE NA ZAČÁTKU HYPOXICKÉ EXPOZICE:

1. Stoupá produkce kyslíkových radikálů v plicích (Wilhelm, Sojková et al. 1996; Johnson, Hodyc et al. 2007).

U laboratorních potkanů podání antioxidantů (NAC) před expozicí hypoxií a/nebo v prvním týdnu expozice hypoxií inhibuje signifikantně rozvoj HPH. Podají-li se antioxidantia zvířatům s rozvinutou HPH jsou bez efektu (Lachmanova, Hnilickova et al. 2005).

2. Stoupá produkce NO v plicích (Hampl, Bibova et al. 2006).

Inhibice syntézy NO v prvních dnech hypoxické expozice částečně brání zvýšení tlaku v a. pulmonalis. Ve fázi, kdy je Ph již rozvinuta nemá inhibice NO syntézy vliv na velikost PAP (HAMPL, Bibova et al. 2006).

3. Množství kolagenních štěpů velikosti, která je charakteristická pro působení MMP 13, v extraktu periferních plicních artérií je signifikantně vyšší (Novotna, Bibova et al. 2001).

4. Žírné buňky ,které jsou zdrojem kolagenolytických metaloproteináz se v iniciálním stádiu HPH soustřeďují v okolí prealveolárních plicních cév (Vajner, Vytasek et al. 2006).

5. Inhibice degranulace žírných buněk v časně fázi hypoxické expozice signifikantně snižuje PH. Inhibice degranulace žírných buněk v pozdní fázi hypoxické expozice PH neovlivní (Baňasová, Maxová et.al.2008).

První dny expozice chronické hypoxii kdy dochází k radikálovému poškození plicní cévní stěny, aktivaci mesenchymálních struktur a indukci plicní vaskulární remodelace jsou rozhodujícím obdobím pro vznik HPH.

6. ZÁVĚRY:

1 / NO se podílí na rozvoji HPH na začátku expozice CH

2 / Zdrojem NO na začátku rozvoje hypoxické plicní hypertenze je iNOS

3 / Kromoglykát podávaný v časné fázi hypoxické expozice výrazně snižuje plicní hypertenzi

4/ Podávání kromoglykátu v pozdní fázi hypoxické expozice PH neovlivní

5/ Degranulace žírných buněk představuje důležitý mechanismus v remodelaci plicních cév při hypoxii- indukované plicní hypertenzi

1. Abraham, A., J. Kay, et al. (1971). "Haemodynamic and pathological study of the effect of chronic hypoxia and subsequent recovery of the heart and pulmonary vasculature of the rat." Cardiovasc Res **5**(1): 95-102.
2. Adnot, S., B. Raffestin, et al. (1991). "Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia." J. Clin. Invest. **87**: 155-162.
3. Anggard, E. (1994). "Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine." Lancet **343**(8907): 1199-206.
4. Archer, S. L. and V. Hampl (1992). "N^G-monomethyl-L-arginine causes nitric oxide synthesis in isolated arterial rings: trouble in paradise." Biochem. Biophys. Res. Commun. **188**(2): 590-596.
5. Archer, S. L., J. P. Tolins, et al. (1989). "Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor." Biochem. Biophys. Res. Commun. **164**: 1198-1205.
6. Bacakova, L., V. Lisa, et al. (2002). "Ultraviolet light-irradiated collagen III modulates expression of cytoskeletal and surface adhesion molecules in rat aortic smooth muscle cells in vitro." Virchows Arch **440**(1): 50-62.
7. Bacakova, L., J. Wilhelm, et al. (1997). "Oxidized collagen stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells." Exp Mol Pathol **64**(3): 185-94.
8. Barer, G., C. Emery, et al. (1993). "Endothelial control of the pulmonary circulation in normal and chronically hypoxic rats." J. Physiol. **463**(1): 1-16.
9. Barer, G., C. Emery, et al. (1993). "Endothelial control of the pulmonary circulation in normal and chronically hypoxic rats." J. Physiol. **463**(1): 1-16.
10. Beall, C., D. Laskowski, et al. (2001). "Pulmonary nitric oxide in mountain dwellers." Nature **414**(6862): 411-2.
11. Beckman, J. S., T. W. Beckman, et al. (1990). "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**(4): 1620-1624.
12. Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly." Am. J. Physiol. **271**: C1424-C1437.
13. Bishop, J., D. Guerreiro, et al. (1990). "Changes in the composition and metabolism of arterial collagens during the development of pulmonary hypertension in rabbits." Am Rev Respir Dis **141**(2): 450-5.

14. Block, E. R., J. M. Patel, et al. (1989). "Mechanism of hypoxic injury to pulmonary artery endothelial cell plasma membranes." Am. J. Physiol. **257**: C223-C231.
15. Botney, M. D., M. J. Liptay, et al. (1993). "Active collagen synthesis by pulmonary arteries in human primary pulmonary hypertension." Am. J. Pathol. **143**(1): 121-129.
16. Bowers, R., C. Cool, et al. (2004). "Oxidative Stress in Severe Pulmonary Hypertension 10.1164/rccm.200301-147OC." Am. J. Respir. Crit. Care Med. **169**(6): 764-769.
17. Bredt, D., P. Hwang, et al. (1990). "Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide." Nature **347**(6295): 768-70.
18. Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule." Annu. Rev. Biochem. **63**: 175-195.
19. Brower, G. L., A. L. Chancey, et al. (2002). "Cause and effect relationship between myocardial mast cell number and matrix metalloproteinase activity 10.1152/ajpheart.00218.2000." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(2): H518-525.
20. Butler, A., F. Flitney, et al. (1995). "NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective." Trends Pharmacol Sci **16**(1): 18-22.
21. Cadogan, E., N. Hopkins, et al. (1999). "Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase without vasodilator effect in chronically infected lungs." Am. J. Physiol. **277**(3 Pt 1): L616-L627.
22. Carville, C., S. Adnot, et al. (1997). "Induction of nitric oxide synthase activity in pulmonary arteries from normoxic and chronically hypoxic rats." Eur. Respir. J. **10**(2): 437-445.
23. Carville, C., B. Raffestin, et al. (1993). "Loss of endothelium-dependent relaxation in proximal pulmonary arteries from rats exposed to chronic hypoxia: effects of in vivo and in vitro supplementation with L-arginine." J. Cardiovasc. Pharmacol. **22**: 889-896.
24. Celermajer, D., K. Sorensen, et al. (1993). "Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents." J. Am. Coll. Cardiol. **22**(3): 854-858.
25. Clancy, R., A. Amin, et al. (1998). "The role of nitric oxide in inflammation and immunity." Arthritis Rheum **41**(7): 1141-51.

26. Clark, R. H., T. J. Kueser, et al. (2000). "Low-dose nitric oxide therapy for persistent pulmonary hypertension of the newborn." N. Engl. J. Med. **342**(7): 469-474.
27. Clutton-Brock, J. (1967). "Two cases of poisoning by contamination of nitrous oxide with higher oxides of nitrogen during anaesthesia." Br. J. Anaesth. **39**(5): 388-392.
28. Comtois, A. S., Q. EL-Dwairi, et al. (1999). "Lipopolysaccharide-induced Diaphragmatic Contractile Dysfunction in Mice Lacking the Inducible Nitric Oxide Synthase." Am. J. Respir. Crit. Care Med. **159**(6): 1975-1980.
29. Crossno, J. T., Jr., C. V. Garat, et al. (2007). "Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(4): L885-897.
30. Cucchiaro, G., A. H. Tatum, et al. (1999). "Inducible nitric oxide synthase in the lung and exhaled nitric oxide after hyperoxia." Am. J. Physiol. **277**(3 Pt 1): L636-L644.
31. Darley-Usmar, V., H. Wiseman, et al. (1995). "Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance." FEBS Lett **369**: 131-135.
32. Darley-Usmar, V., H. Wiseman, et al. (1995). "Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance." FEBS Lett **369**(2-3): 131-5.
33. DiGregorio, K. A., E. V. Cilento, et al. (1987). "Measurement of superoxide release from single pulmonary alveolar macrophages." Am. J. Physiol. **252**: C677-C683.
34. Dillon, W., V. Hampl, et al. (1996). "Origins of breath nitric oxide in humans." Chest **110**(4): 930-938.
35. Dillon, W. C., V. Hampl, et al. (1996). "Origins of breath nitric oxide in humans." Chest **110**(4): 930-938.
36. Dinh-Xuan, A., T. Higenbottam, et al. (1991). "Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease." N. Engl. J. Med. **324**(22): 1539-1547."
37. Dumas, J. P., M. Dumas, et al. (1994). "Effects of two K⁺ channel openers, aprikalim and pinacidil, on hypoxic pulmonary vasoconstriction." Eur. J. Pharmacol. **263**(1-2): 17-23.
38. Eddahibi, S., V. Fabre, et al. (1999). "Induction of Serotonin Transporter by Hypoxia in Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cells : Relationship With the Mitogenic Action of Serotonin." Circ. Res. **84**(3): 329-336.

39. Fagan, K., B. Morrissey, et al. (2001). "Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension." Respir Res **2**(5): 306-13.
40. Frank, D. U., D. J. Horstman, et al. (1998). "Regulation of the endogenous NO pathway by prolonged inhaled NO in rats." J Appl Physiol **85**(3): 1070-1078.
41. Freeman, B. (1994). "Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side." Chest **105**(3 Suppl): 79S-84S.
42. Fulton (1952).
43. Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-6.
44. Gardi, C., P. Calzoni, et al. (1994). "Collagen breakdown products and lung collagen metabolism: an in vitro study on fibroblast cultures." Thorax **49**(4): 312-318.
45. Gardi, C., A. Pacini, et al. (1990). "Development of interstitial lung fibrosis by long-term treatment with collagen breakdown products in rabbits." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **68**(2): 235-50.
46. Gardiner, S., A. Compton, et al. (1990). "Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide." Hypertension **15**(5): 486-492.
47. Gaston, B., J. Drazen, et al. (1994). "The biology of nitrogen oxides in the airways." Am. J. Respir. Crit. Care Med. **149**(2): 538-551.
48. Geiger, M., A. Stone, et al. (1997). "Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **273**(1): L275-281.
49. Gess, B., K. Schricker, et al. (1997). "Acute hypoxia upregulates NOS gene expression in rats." Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol **273**(3): R905-910.
50. Ghafourifar, P. and C. Richter (1997). "Nitric oxide synthase activity in mitochondria." FEBS Lett **418**(3): 291-6.
51. Giulivi, C., J. J. Poderoso, et al. (1998). "Production of Nitric Oxide by Mitochondria10.1074/jbc.273.18.11038." J. Biol. Chem. **273**(18): 11038-11043.
52. Griffiths, M. J., S. Liu, et al. (1995). "In vivo treatment with endotoxin induces nitric oxide synthase in rat main pulmonary artery." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **268**(3): L509-518.

53. Haddad, I., G. Pataki, et al. (1994). "Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury." J Clin Invest **94**(6): 2407-13.
54. Hampl, V., S. L. Archer, et al. (1993). "Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure." J Appl Physiol **75**(4): 1748-1757.
55. Hampl, V., S. L. Archer, et al. (1993). "Chronic ERDF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure." Journal of Applied Physiology. **75**: 1748-1757.
56. Hampl, V., J. Bibova, et al. (2006). "Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(1): L11-20.
57. Hampl, V., J. Bibova, et al. (2006). "Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension10.1152/ajplung.00023.2005." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(1): L11-20.
58. Hampl, V. and J. Herget (1990). "Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia." Am Rev Respir Dis **142**(3): 619-24.
59. Hampl, V. and J. Herget (2000). "Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Chronic Pulmonary Hypertension." Physiol Rev **80**(4): 1337-1372.
60. Harada, S., T. Imaki, et al. (1999). "Distinct distribution and time-course changes in neuronal nitric oxide synthase and inducible NOS in the paraventricular nucleus following lipopolysaccharide injection." Brain Res **821**(2): 322-32.
61. Hasunuma, K., T. Yamaguchi, et al. (1991). "Effects of inhibitors of EDRF and EDHF on vasoreactivity of perfused rat lungs." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **260**(2): L97-104.
62. Heath, D. (1977). "Hypoxia and the pulmonary circulation." J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol) **11**: 21-9.
63. Heller, J. and S. Hellerova (1998). "Long-term effect on blood pressure of early brief treatment by different antihypertensive agents: a study in the prague hypertensive rat." Kidney Blood Press Res **21**(6): 445-51.
64. Herget, J. and V. Ježek (1989). Pulmonary hypertension in chronic lung disease. Pulmonary Hypertension. Problems and Controversies. H. Denolin and C. A. Wagenvoort, Elsevier Publ. Co.: 142 - 162.
65. Herget, J., J. Novotna, et al. (1999). "Hypoxic pulmonary hypertension in rats is inhibited by antioxidant, N-acetylcysteine." Phys. Res. **P 48**: 54.

- 66: Herget, J., J. Novotna, et al. (2003). "Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(1): L199-208.
- 67: Herget, J. and F. Palecek (1972). "Pulmonary arterial blood pressure in closed chest rats. Changes after catecholamines, histamine and serotonin." Arch Int Pharmacodyn Ther **198**(1): 107-17.
- 68: Herget, J. and F. Palecek (1978). "Experimental chronic pulmonary hypertension." Int Rev Exp Pathol **18**: 347-406.
- 69: Herget, J. and F. Palecek (1985). "[Experimental chronic pulmonary hypertension in laboratory animals]." Vnitr Lek **31**(3): 292-6.
- 70: Herget, J. and F. Paleček (1975). "Experimental pulmonary hypertension." 2nd International Congress on Pathological Physiology. Abstracts.
- 71: Herget, J., A. Suggett, et al. (1978). "Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia." Thorax **33**(4): 468-473.
- 72: Herget, J., J. Wilhelm, et al. (2000). "A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension." Physiol Res **49**(5): 493-501.
- 73: Hickey, M., K. Sharkey, et al. (1997). "Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte- endothelium interactions in endotoxemia." FASEB J **11**(12): 955-964.
- 74: Hislop, A. and L. Reid (1977). "Changes in the pulmonary arteries of the rat during recovery from hypoxia-induced pulmonary hypertension." BJEP **58**: 653-662.
- 75: Hislop, A. and L. Reid (1978). "Normal structure and dimensions of the pulmonary arteries in the rat." Journal Anatomy **125**: 71-83.
- 76: Hoshikawa, Y., S. Ono, et al. (2001). "Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia." J Appl Physiol **90**(4): 1299-1306.
- 77: Hoshikawa, Y., S. Ono, et al. (1995). "Contribution of oxidative stress to pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia." Nippon Kyobu shokkan Gakki Yas **33**: 1169-1173.
- 78: Chang, S., T. Stelzner, et al. (1989). "Hypoxia increases plasma glutathione disulfide in rats." Lung **167**(5): 269-76.

79. Chen, L.-W., C.-F. Chen, et al. (1999). "Chronic activation of neurokinin-1 receptor induces pulmonary hypertension in rats." Am. J. Physiol. **276**(5): H1543-H1551.
80. Igari, H., K. Tatsumi, et al. (1998). "Role of EDRF in pulmonary circulation during sustained hypoxia." J Cardiovasc Pharmacol **31**(2): 299-305.
81. Ignarro, L. J., G. M. Buga, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9265-9.
82. Isaacson, T. C., V. Hampl, et al. (1994). "Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats." J Appl Physiol **76**(2): 933-940.
83. Iwase, K., K. Miyanaka, et al. (2000). "Induction of Endothelial Nitric-oxide Synthase in Rat Brain Astrocytes by Systemic Lipopolysaccharide Treatment 10.1074/jbc.275.16.11929." J. Biol. Chem. **275**(16): 11929-11933.
84. Janicki, J., K. Weber, et al. (1985). "The pressure-flow response of the pulmonary circulation in patients with heart failure and pulmonary vascular disease." Circulation **72**(6): 1270-1278.
85. Johnson, E., D. Hodyc, et al. (2007). "Superoxide production during chronic ventilatory hypoxia." Physiol. Res. **56**(3g): 15.
86. Kaisers, U., T. Busch, et al. (2003). "Selective pulmonary vasodilation in acute respiratory distress syndrome." Crit Care Med **31**(4 Suppl): S337-42.
87. Kawai, N., D. B. Bloch, et al. (1995). "Constitutive endothelial nitric oxide synthase gene expression is regulated during lung development." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **268**(4): L589-595.
88. Kay, J., K. Suyama, et al. (1981). "Mast cell stabilizing compound FPL 55618 reduces right ventricular hypertrophy and lung mast cell hyperplasia in chronically hypoxic rats." Experientia **37**(1): 75-6.
89. Kay, J. M., K. L. Suyama, et al. (1981). "Mast cell stabilizing compound FPL 55618 reduces right ventricular hypertrophy and lung mast cell hyperplasia in chronically hypoxic rats." Experientia **37**(1): 75-6.
90. Kay, J. M., J. C. Waymire, et al. (1974). "Lung mast cell hyperplasia and pulmonary histamine-forming capacity in hypoxic rats." Am J Physiol **226**(1): 178-84.
91. Kelley, J., D. Chi, et al. (2000). "The molecular role of mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease." Mol Med Today **6**(8): 304-8.

92. Kerr, J. S., C. L. Ruppert, et al. (1987). "Reduction of chronic hypoxic pulmonary hypertension in the rat by an inhibitor of collagen production." Am. Rev. Resp. Dis. **135**: 300-306.
93. Kinnula, V. L., J. D. Crapo, et al. (1995). "Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung." Lab. Investigat. **73**: 3-19.
94. Kinsella, J., W. Walsh, et al. (1999). "Inhaled nitric oxide in premature neonates with severe hypoxaemic respiratory failure: a randomised controlled trial." Lancet **354**(9184): 1061-5.
95. Kleschyov, A., B. Muller, et al. (1998). "Role of adventitial nitric oxide in vascular hyporeactivity induced by lipopolysaccharide in rat aorta." Br J Pharmacol **124**(4): 623-6.
96. Knäuper, V., C. López-Otin, et al. (1996). "Biochemical Characterization of Human Collagenase-3 10.1074/jbc.271.3.1544." J. Biol. Chem. **271**(3): 1544-1550.
97. Knowles, R., M. Merrett, et al. (1990). "Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat." Biochem J **270**(3): 833-6.
98. Knowles, R. G. (1996). "Nitric oxide synthases." Biochem. Soc. Trans. **24**: 875-878.
99. Knowles, R. G. (1997). "Nitric oxide biochemistry." Biochemical Society Transactions **25**(3): 895-901.
100. Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." Biochem J **298**(Pt 2): 249-58.
101. Kolar, F., B. Ostadal, et al. (1989). "Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats." Respiration **56**(1-2): 57-62.
102. Lachmanova, V., O. Hnilickova, et al. (2005). "N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia." Life Sci **77**(2): 175-82.
103. Le Cras, T. D., C. Xue, et al. (1996). "Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **270**(1): L164-170.
104. Leeman, M., V. Z. De Beryl, et al. (1994). "Effects of endogenous nitric oxide on pulmonary vascular tone in intact dogs." American journal of Physiology **266**: H2343-H2347.

105. Leone, A. M., R. M. Palmer, et al. (1991). "Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline." J Biol Chem **266**(35): 23790-5.
106. Lovchik, J., M. Lipscomb, et al. (1997). "Expression of lung inducible nitric oxide synthase protein does not correlate with nitric oxide production in vivo in a pulmonary immune response against *Cryptococcus neoformans*." J. Immunol. **158**(4): 1772-1778.
107. Lundberg, J., T. Farkas-Szallasi, et al. (1995). "High nitric oxide production in human paranasal sinuses." Nat Med **1**(4): 370-3.
108. Marcos, E., E. Fadel, et al. (2004). "Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia in Various Forms of Human Pulmonary Hypertension10.1161/01.RES.0000126847.27660.69." Circ. Res. **94**(9): 1263-1270.
109. Maruyama, J. and K. Maruyama (1994). "Impaired nitric oxide-dependent responses and their recovery in hypertensive pulmonary arteries of rats." Am. J. Physiol. **266**(6 Part 2): H2476-H2488.
110. Matsuo, N., T. Shimoda, et al. (2000). "Effects of sodium cromoglycate on cytokine production following antigen stimulation of a passively sensitized human lung model." Ann Allergy Asthma Immunol **84**(1): 72-8.
111. Maxova, H., J. Novotna, et al. (2004). "Effect of N-acetylcysteine on tissue metalloproteinases activity in RBL- 2H3 mast cells exposed to 24 hours of "in vitro" hypoxia." Phys. Res. **53**: P 24.
112. Maxova, H., J. Novotná, et al. (2002). "Hypoxia increases synthesis of metalloproteinases in isolated lung mast cells." Physiol. Res. **51**: 69.
113. McCormack, D. G. and N. A. M. Paterson (1993). "Loss of hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronic pneumonia is not mediated by nitric oxide." Am. J. Physiol. **265**(5 Part 2): H1523-H1528.
114. Monboisse, J. and J. Borel (1992). "Oxidative damage to collagen." EXS **62**: 323-7.
115. Monboisse, J., M. Gardes-Albert, et al. (1988). "Collagen degradation by superoxide anion in pulse and gamma radiolysis." Biochim Biophys Acta **965**(1): 29-35.
116. Moncada, S. (1994). "Nitric oxide." J Hypertens Suppl **12**(10): S35-9.
117. Moncada, S. and A. Higgs (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." N. Engl. J. Med. **329**(27): 2002-2012
118. Moncada, S. and J. F. Martin (1993). "Vasodilation - evolution of nitric oxide." Lancet **341**(8859): 1511.

119. Moncada, S., R. M. J. Palmer, et al. (1989). "Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine." Biochem. Pharmacol. **38**: 1709-1715.
120. Moncada, S., R. M. J. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol. Rev. **43**: 109-142.
121. Moore, W., R. Webber, et al. (1994). "L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase." J Med Chem **37**(23): 3886-8.
122. Moore, W. M., R. K. Webber, et al. (1994). "L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase." J. Med. Chem. **37**(23): 3886-3888.
123. Mungall, I. P. F. (1976). "Hypoxia and lung mast cells: influence of disodium cromoglycate." Thorax **31**: 94-100.
124. Nakanishi, K., F. Tajima, et al. (1995). "Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats." J. Physiol. **489**(3): 869-876.
125. Nakayama, D., D. Geller, et al. (1992). "Cytokines and lipopolysaccharide induce nitric oxide synthase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle." Am J Respir Cell Mol Biol **7**(5): 471-6.
126. Nathan, C. and Q. W. Xie (1994). "Regulation of biosynthesis of nitric oxide." J Biol Chem **269**(19): 13725-8.
127. Novotna, J., J. Bibova, et al. (2001). "Hyperoxia and recovery from hypoxia alter collagen in peripheral pulmonary arteries similarly." Physiol Res **50**(2): 153-63.
128. Novotna, J. and J. Herget (1998). "Exposure to chronic hypoxia induces qualitative changes of collagen in the walls of peripheral pulmonary arteries." Life Sci **62**(1): 1-12.
129. Novotna, J. and J. Herget (1998). "Exposure to chronic hypoxia induces qualitative changes of collagen in the walls of peripheral pulmonary arteries." Life Sci **62**(1): 1-12.
130. Novotna, J. and J. Herget (2002). "Possible role of matrix metalloproteinases in reconstruction of peripheral pulmonary arteries induced by hypoxia." Physiol Res **51**(4): 323-34
131. Novotná, J. and J. Herget (1998). "Exposure to chronic hypoxia induces qualitative changes of collagen in the walls of peripheral pulmonary arteries." Life Sci. **62**(1): 1-12
132. Novotná, J., J. Herget, et al. (1999). Inhibitor of collagenolytic activity suppresses hypoxic pulmonary hypertension in rats. Physiol. Res. **48**: 45P.

133. Ogata, M., M. Ohe, et al. (1992). "Modulatory role of EDRF in hypoxic contraction of isolated porcine pulmonary arteries." Am. J. Physiol. **262**: H691-H697.
134. Oka, M., K. Hasunuma, et al. (1993). "EDRF suppresses an unidentified vasoconstrictor mechanism in hypertensive rat lungs." Am. J. Physiol. **264**(6 Part 1): L587-L597.
135. Oka, M., N. Homma, et al. (2007). "Rho Kinase-Mediated Vasoconstriction Is Important in Severe Occlusive Pulmonary Arterial Hypertension in Rats10.1161/01.RES.0000261658.12024.18." Circ. Res. **100**(6): 923-929
136. Palmer, L. A., G. L. Semenza, et al. (1998). "Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **274**(2): L212-219.
137. Palmer, M. J. and S. Moncada (1989). "A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells." Biochem. Biophys. Res. Commun. **158**: 348-352.
138. Palmer, R. M., A. G. Ferrige, et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature **327**(6122): 524-6.
139. Palmer, R. M. J., D. D. Rees, et al. (1988). "L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation." Biochem. Biophys. Res. Commun. **153**: 1251-1256.
140. Patel, R., J. McAndrew, et al. (1999). "Biological aspects of reactive nitrogen species." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 385-400.
141. Pechanova, O. and I. Bernatova (1996). "Effect of long-term NO synthase inhibition on cyclic nucleotide content in rat tissues." Physiol Res **45**(4): 305-9.
142. Persson, M. G., L. E. Gustafsson, et al. (1990). "Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo." Acta Physiol. Scand. **140**: 449-457.
143. Persson, M. G., H. Kalzén, et al. (1994). "Oxygen or low concentrations of nitric oxide reverse pulmonary vasoconstriction induced by nitric oxide synthesis inhibition in rabbits." Acta Physiol. Scand. **150**(4): 405-411.
144. Quinn, A. C. and P. Vallance (1993). "Inhaled nitric oxide - from pollutant to patent." Eur. J. Clin. Invest. **23**(8): 445-447.
145. Rabinovitch, M. (1999). "EVE and beyond, retro and prospective insights." Am. J. Physiol. **277**(1): L5-L12.

146. Rabinovitch, M., W. Gamble, et al. (1979). "Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features." Am. J. Physiol. **236**: H818-H827.
147. Rabinovitch, M., W. J. Gamble, et al. (1981). "Age and sex influence on pulmonary hypertension of chronic hypoxia and on recovery." Am. J. Physiol. **240**: H62-H72.
148. Rajagopalan, S., X. P. Meng, et al. (1996). "Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro: implications for atherosclerotic plaque stability." J. Clin. Invest. **98**(11): 2572-2579.
149. Rakusan, K., K. Sarkar, et al. (1990). "Mast cells in the rat heart during normal growth and in cardiac hypertrophy." Circ. Res. **66**(2): 511-516.
150. Rathke-Hartlieb, S., P. Budde, et al. (2000). "Elevated expression of membrane type 1 metalloproteinase (MT1-MMP) in reactive astrocytes following neurodegeneration in mouse central nervous system." FEBS Lett **481**(3): 227-34.
151. Rees, D. D., R. M. Palmer, et al. (1990). "Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo." Br. J. Pharmacol. **101**(3): 746-752.
152. Rees, D. D., R. M. J. Palmer, et al. (1989). "Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 3375-3378.
153. Reid, L. M. (1986). "Structure and function in pulmonary hypertension: new perceptions." Chest **89**: 279-288.
154. Resta, T. C., L. G. Chicoine, et al. (1999). "Maintained upregulation of pulmonary eNOS gene and protein expression during recovery from chronic hypoxia." Am. J. Physiol. **276**(2): H699-H708.
155. Resta, T. C., T. L. O'Donoghue, et al. (1999). "Unaltered vasoconstrictor responsiveness after iNOS inhibition in lungs from chronically hypoxic rats." Am. J. Physiol. **276**(1 Pt 1): L122-L130.
156. Resta, T. C., T. L. O'Donoghue, et al. (1999). "Unaltered vasoconstrictor responsiveness after iNOS inhibition in lungs from chronically hypoxic rats." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **276**(1): L122-130
157. Richards, F., P. Smith, et al. (1980). "The influence of hypoxia on the population density of alveolar macrophages in the lungs of rats." Invest Cell Pathol **3**(4): 409-13.

158. Riley, D., S. Thakker-Varia, et al. (2000). "Role of proteolysis and apoptosis in regression of pulmonary vascular remodeling." Physiol Res **49**(5): 577-85.
159. Riley, M., J. Porszasz, et al. (1997). "Exhaled nitric oxide during exercise in primary pulmonary hypertension and pulmonary fibrosis." Chest **111**(1): 44-50.
160. Robertson, B. E., J. B. Warren, et al. (1990). "Inhibition of nitric oxide synthesis potentiates hypoxic vasoconstriction in isolated rat lungs." Exp. Physiol. **75**: 255-257.
161. Rodman, D. M., T. Yamaguchi, et al. (1990). "Effects of hypoxia on endothelium-dependent relaxation of rat pulmonary artery." Am. J. Physiol. **258**: L207-L214.
162. Rubbo, H., R. Radi, et al. (1994). "Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives." J. Biol. Chem. **269**(42): 26066-26075.
163. Rubbo, H., R. Radi, et al. (1994). "Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives." J. Biol. Chem. **269**(42): 26066-26075.
164. Shaul, P., A. North, et al. (1995). "Prolonged in vivo hypoxia enhances nitric oxide synthase type I and type III gene expression in adult rat lung." Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **13**(2): 167-174.
165. Shellito, J., M. Sniezek, et al. (1987). "Acquisition of peroxidase activity by rat alveolar macrophages during pulmonary inflammation." Am. J. Pathol. **129**: 567-577.
166. Schwartz, D., M. Mendonca, et al. (1997). "Inhibition of Constitutive Nitric Oxide Synthase (NOS) by Nitric Oxide Generated by Inducible NOS after Lipopolysaccharide Administration Provokes Renal Dysfunction in Rats." J. Clin. Invest. **100**(2): 439-448.
167. Sprague, R. S., C. Thiemermann, et al. (1992). "Endogenous endothelium-derived relaxing factor opposes hypoxic pulmonary vasoconstriction and supports blood flow to hypoxic alveoli in anesthetized rabbits." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 8711-8715.
168. Steiner, D. R. S., N. C. Gonzalez, et al. (2003). "Mast cells mediate the 168. microvascular inflammatory response to systemic hypoxia10.1152/jappphysiol.00637.2002." J Appl Physiol **94**(1): 325-334.

169. Stenmark, K. R. and I. F. McMurtry (2005). "Vascular Remodeling Versus Vasoconstriction in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension: A Time for Reappraisal?10.1161/01.RES.00000175934.68087.29." Circ. Res. **97**(2): 95-98.
170. Stuehr, D. J. (1997). "Structure-function aspects in the nitric oxide synthases." Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **37**: 339-359.
171. Teng, X., D. Li, et al. (2002). "C/EBP- β Mediates iNOS Induction by Hypoxia in Rat Pulmonary Microvascular Smooth Muscle Cells10.1161/hh0202.103647." Circ. Res. **90**(2): 125-127.
172. Theoharides, T. C., L. Wang, et al. (2000). "Cloning and Cellular Localization of the Rat Mast Cell 78-kDa Protein Phosphorylated in Response to the Mast Cell "Stabilizer" Cromolyn." J. Pharmacol. Exp. Ther. **294**(3): 810-821.
173. Tozzi, C. A., S. Thakker-Varia, et al. (1998). "Mast cell collagenase correlates with regression of pulmonary vascular remodeling in the rat." Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **18**(4): 497-510.
174. Tozzi, C. A., S. Thakker-Varia, et al. (1998). "Mast cell collagenase correlates with regression of pulmonary vascular remodeling in the rat." Am J Respir Cell Mol Biol **18**(4): 497-510.
175. Tucker, A., I. F. McMurtry, et al. (1977). "Lung mast cell density and distribution in chronically hypoxic animals." J. Appl. Physiol. **42**: 174-178.
176. Tucker, E., J. Ledingham, et al. (2000). "Effects of chronic inhibition of nitric oxide synthase in the genetically hypertensive rat." Clin Exp Pharmacol Physiol **27**(8): 647-9.
177. Tyler, R. C., M. Muramatsu, et al. (1999). "Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **276**(2): L297-303.
178. Underwood, D. C., S. Bochnowicz, et al. (1998). "Chronic hypoxia-induced cardiopulmonary changes in three rat strains: inhibition by the endothelin receptor antagonist SB 217242." J. Cardiovasc. Pharmacol. **31**(Suppl. 1): S453-S455.
179. Vajner, L., R. Vytasek, et al. (2006). "Acute and chronic hypoxia as well as 7-day recovery from chronic hypoxia affects the distribution of pulmonary mast cells and their MMP-13 expression in rats." Int J Exp Pathol **87**(5): 383-91.
180. Vaughan, D. J., T. V. Brogan, et al. (2003). "Contributions of nitric oxide synthase isozymes to exhaled nitric oxide and hypoxic pulmonary vasoconstriction in rabbit lungs." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(5): L834-843.

181. Vinten-Johansen, J. (2000). "Physiological Effects of Peroxynitrite : Potential Products of the Environment." Circ. Res. **87**(3): 170-172.
182. Voelkel, N. (1997). "Appetite suppressants and pulmonary hypertension." Thorax **52**(90003): S63-67.
183. Von Euler, U. and G. Liljestrand (1946). "Observation on the pulmonary arterial blood pressure in the cat." Acta Physiol Scand **12**: 301-320.
184. Weir, E. K. (1984). "Diagnosis and management of primary pulmonary hypertension." Pulmonary hypertension: 115-168.
185. Weir, E. K. and S. L. Archer (1995). "The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels." FASEB J. **9**(2): 183-189.
186. Welle, M. (1997). "Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase." J. Leukoc. Biol. **61**(3): 233-245.
187. West, J. B., C. T. Dollery, et al. (1964). "Distribution of blood flow in isolated lung; relation to vascular and alveolar pressures." J Appl Physiol **19**(4): 713-724.
188. Widimsky, J., Ed. (1975). Pulmonary Hypertension. Progress in Respiration Research. Basel, Karger.
189. Widimsky, J. (1976). Plicní hypertenze. Praha, Avicenum.
190. Wilhelm, J., J. Sojková, et al. (1996). "Production of hydrogen peroxide by alveolar macrophages from rats exposed to subacute and chronic hypoxia." Physiol. Res. **45**(3): 185-191.
191. Wilhelm, J., M. Vankova, et al. (2003). "Hydrogen peroxide production by alveolar macrophages is increased and its concentration is elevated in the breath of rats exposed to hypoxia: relationship to lung lipid peroxidation." Physiol Res **52**(3): 327-32.
192. Xue, C. and R. A. Johns (1996). "Upregulation of nitric oxide synthase correlates temporally with onset of pulmonary vascular remodeling in the hypoxic rat." Hypertension **28**: 743-753.
193. Xue, C. and R. A. Johns (1996). "Upregulation of Nitric Oxide Synthase Correlates Temporally With Onset of Pulmonary Vascular Remodeling in the Hypoxic Rat." Hypertension **28**(5): 743-753.
194. Xue, C., A. Rengasamy, et al. (1994). "Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **267**(6): L667-678.

195. Xue, C., A. Rengasamy, et al. (1994). "Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia." Am. J. Physiol. **267**(6): L667-L678.
196. Yuan, X.-J., M. L. Tod, et al. (1990). "Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries." Am. J. Physiol. **259**: H281-H289.
197. Zhao, L., D. E. Crawley, et al. (1993). "Endothelium-derived relaxing factor activity in rat lung during hypoxic pulmonary vascular remodeling." J. Appl. Physiol. **74**(3): 1061-1065.
198. Zhu, Y. J., R. Kradin, et al. (1983). "Hypoxic pulmonary hypertension in the mast cell-deficient mouse." J. Appl. Physiol. **54**: 680-686.

SEZNAM PUBLIKACÍ

HAMPL V, BÍBOVÁ J, BANASOVÁ A, UHLÍK J, MIKOVÁ D, HNILICKOVÁ O, LACHMANOVÁ V, HERGET J

Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006, Jan; 290(1): L 11- 20. Epub 2005 Aug 19.

PIMD: 16113050 (PubMed- indexed for MEDLINE)

BAÑASOVÁ A, MAXOVÁ H, HAMPL V, VÍZEK M, POVÝŠILOVÁ V, NOVOTNÁ J, VAJNEROVÁ O, HNILICKOVÁ O, HERGET J.

Prevention of Mast Cell Degranulation by Disodium Cromoglycate Attenuates the Development of Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats Exposed to Chronic Hypoxie.

Respiration. 2008 Mar 18; (Epub ahead of print)

PIMD: 18349522(PubMed- as supplied by publisher)

Seznam abstrakt:

1. Banasova, A., J. Bibova, et al. (2001). "Pulmonary vasoconstriction-induced nitric oxide (NO) synthesis depends on calcium release from endoplasmic reticulum (ER)." Physiol. Res. **50**(6): P35.
2. Banasova, A., J. Bibova, et al. (2001). "Sarcoplasmic reticulum calcium pump participates in the mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction." Physiol. Res. **50**(5): P1.
3. Banasová, A., J. Bíbová, et al. (2002). "Gender differences in the role of calcium release from sarcoplasmic reticulum in the pulmonary vascular tone regulation." Physiol. Res. **51**(5): 71.
4. Banasová, A., J. Bíbová, et al. (2003). "Gender difference in pulmonary vascular handling of intracellular calcium is abolished by orchietomy." Physiol. Res. **52**(3): 23.
5. Baňasová, A., J. Bíbová, et al. (2004). "Chronic hypoxia alters nitric oxide in exhaled breath: newborn rats differ from adults." Physiol. Res. **53**(3).
6. Bíbová, J., D. Miková, et al. (2002). "Inducible nitric oxide synthase participates in the mechanism of chronic hypoxic pulmonary hypertension." Physiol. Res. **51**(6): 71P.
7. Bíbová, J., D. Miková, et al. (2003). "Time profile of breath NO release during three week hypoxia." Physiol. Res. **52**(3): 24.
8. Bíbová, J., D. Miková, et al. (2003). "Inducible nitric oxide synthase contributes to the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension." FASEB J. Physiol. Res. **51**, **252**(5, 4): 71, 408.
9. Bíbová, J. B. A., Herget J., Hampl V. (2004). "Slowly reversible normalization of blood pressure by 2-week hypoxia in ren-2 transgenic rat model of hypertension." Physiol. Res. **53**(3): 1.
10. Fisarkova, B., R. Vytasek, et al. (2002). "Hyperoxia attenuated nitrotyrosine concentration in the lung tissue of carrageenan treated rats." Physiol. Res. **51**: 66P.
11. Hampl, V., J. Bíbová, et al. (2002). "Prolonged, selective inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in intact rats by addition of L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine (L-NIL) to drinking water." Nitric Oxide: Biology and Chemistry. **6**: 398-399.
12. Herget, J., R. Vytasek, et al. (2001). "Hypercapnia inhibits hypoxic pulmonary hypertension in rats." Physiol. Res. **50**: P7.

PŘÍLOHA A

Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension

Václav Hampl,^{1,5} Jana Bíbová,^{1,5} Alena Baňasová,^{2,5} Jiří Uhlík,³ Dana Miková,^{1,5}
Olga Hnilíčková,^{1,5} Věra Lachmanová,^{4,5} and Jan Herget^{1,5}

Departments of ¹Physiology, ²Pathophysiology, ³Histology, and ⁴Anesthesiology, Charles University
Second Medical School; and ⁵Centre for Cardiovascular Research, Prague, Czech Republic

Submitted 12 January 2005; accepted in final form 3 August 2005

Hampl, Václav, Jana Bíbová, Alena Baňasová, Jiří Uhlík, Dana Miková, Olga Hnilíčková, Věra Lachmanová, and Jan Herget. Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L11–L20, 2006. First published August 19, 2005; doi:10.1152/ajplung.00023.2005.—Pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension is initiated by oxidative injury to the pulmonary vascular wall. Because nitric oxide (NO) can contribute to oxidative stress and because the inducible isoform of NO synthase (iNOS) is often upregulated in association with tissue injury, we hypothesized that iNOS-derived NO participates in the pulmonary vascular wall injury at the onset of hypoxic pulmonary hypertension. An effective and selective dose of an iNOS inhibitor, L-N^G-(1-*N*-ethyl)lysine (L-NIL), for chronic peroral treatment was first determined (8 mg/l in drinking water) by measuring exhaled NO concentration and systemic arterial pressure after LPS injection under ketamine+xylozine anesthesia. A separate batch of rats was then exposed to hypoxia (10% O₂) and given L-NIL or a nonselective inhibitor of all NO synthases, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 500 mg/l), in drinking water. Both inhibitors, applied just before and during 1-wk hypoxia, equally reduced pulmonary arterial pressure (PAP) measured under ketamine+xylozine anesthesia. If hypoxia continued for 2 more wk after L-NIL treatment was discontinued, PAP was still lower than in untreated hypoxic controls. Immunostaining of lung vessels showed negligible iNOS presence in control rats, striking iNOS expression after 4 days of hypoxia, and return of iNOS immunostaining toward normally low levels after 20 days of hypoxia. Lung NO production, measured as NO concentration in exhaled air, was markedly elevated as early as on the first day of hypoxia. We conclude that transient iNOS induction in the pulmonary vascular wall at the beginning of chronic hypoxia participates in the pathogenesis of pulmonary hypertension.

pulmonary circulation; nitric oxide; rat; inducible nitric oxide synthase

SINCE THE DISCOVERY THAT NITRIC OXIDE (NO) is formed in mammalian cells as an endogenous mediator, many attempts were made to define its possible role in the pathogenesis of pulmonary hypertension (reviewed in Ref. 23). Although the capacity of lung vessels to produce NO can be reduced in terminal phases of severe pulmonary hypertension (15), possibly due to the progressive endothelial damage, less advanced stages (at least in adults) are associated with increased expression of NO synthase (NOS) and augmented NO production (reviewed in Ref. 23). This is particularly well documented in

the frequently used and clinically relevant model of pulmonary hypertension elicited by chronic hypoxia.

In principle, as the actions of NO in the body are multifaceted, two main functional consequences of the elevated lung NO synthesis in chronic hypoxic pulmonary hypertension are possible. On one hand, the vasodilator and antiproliferative effects of NO may limit the extent of pulmonary vascular resistance elevation. This possibility is supported by numerous reports that acute administration of NOS blockers, such as N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), increases perfusion pressure in lungs isolated from chronically hypoxic animals more than in normoxic controls (reviewed in Ref. 23). On the other hand, due to its radical nature, NO may contribute to the oxidative injury to the walls of the pulmonary vessels that appears to initiate their morphological remodeling (27, 28, 35). Such a hypertension-promoting effect may more or less negate the tone- and proliferation-reducing effects.

Evidence is accumulating that the principal free radical insult that initiates the process of vascular remodeling occurs during the first few days of chronic hypoxia. For example, indexes of pulmonary hypertension, determined at the end of a prolonged hypoxia, are reduced in rats that were treated with antioxidants at the beginning of the exposure (28, 35). By analogy, the present study was designed to test the hypothesis that elevated lung NO production in the first few days of chronic hypoxia contributes to the development of pulmonary hypertension, presumably by contributing to oxidative vascular wall injury. We reasoned that if this hypothesis were true, then treatment with NOS inhibitor only during the first week of hypoxia would result in reduced pulmonary hypertension.

Chronic hypoxia increases NOS expression in the lung vessels (reviewed in Ref. 23). Traditionally, functional role was implicitly assumed for the endothelial NOS isoform (eNOS). The possible role of the inducible NOS (iNOS, also called NOS II) is unknown, yet there are analogies from other organs that iNOS is functionally significant in situations characterized by tissue injury. Therefore, we also hypothesized that NO participating in the pathogenesis of pulmonary hypertension at the beginning of chronic hypoxia is produced mostly by iNOS. Treatment of hypoxic rats with a relatively selective iNOS inhibitor, L-N^G-(1-*N*-ethyl)lysine (L-NIL) (21, 40), was used to test this hypothesis. In addition, iNOS expression was evaluated with immunohistochemistry at the initial and advanced stages of hypoxia (days 4 and 20, respectively). The results were reported in a preliminary form (6, 21).

Address for reprint requests and other correspondence: Václav Hampl, Dept. of Physiology, Charles Univ. Second Medical School, Pflzeňská 130/221, P50 00, Prague 5, Czech Republic (e-mail: vaclav.hampl@lf2.cuni.cz).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

METHODS

The project was performed on adult male Wistar specific pathogen-free rats (Anlab, Prague, Czech Republic). The experiments conformed to the European Community and National Institutes of Health guidelines for using experimental animals and were approved by the Animal Research Committee of the Charles University Second Medical School. Unless stated otherwise, all drugs were from Sigma (Prague, Czech Republic).

Dose of L-NIL for long-term, peroral use in rats. L-NIL has been reported to relatively selectively inhibit iNOS, but not other NOS isoforms, in *in vitro* experiments and when administered acutely to anesthetized animals (40). However, no data were available regarding effective and selective dose for a prolonged, peroral administration. To find it, we gave one group of rats L-NIL in drinking water at a dose of 3 mg/l ($n = 7$); another group received 8 mg/l ($n = 7$). The third group received plain water to serve as controls ($n = 8$). As a comparison with a well-described, nonselective NOS blocker, the fourth group received L-NAME (500 mg/l, $n = 7$). Because inhibition of eNOS is known to increase systemic arterial pressure (SAP) (47), we measured systolic arterial pressure noninvasively with a tail cuff (25) after 3 days of treatment to make sure that L-NIL at the selected doses did not inhibit eNOS. Subsequently, the rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg body wt ip) and xylazine (16 mg/kg im) and intubated via tracheotomy. Exhaled gas was collected via a two-way valve into a small bag (made from a condom). The groups did not differ in the time needed to fill the bag (~2 min). NO concentration in the collected gas was analyzed with a chemiluminescence analyzer (CLD 77 AM; EcoPhysics, Duernten, Switzerland). After the first NO measurement, the rats were injected with LPS (5 mg/kg body wt) into the jugular vein to induce iNOS expression. Exhaled gas NO analysis was then repeated every 60 min.

Inhibition of NOS during 1-wk hypoxia. To test the hypothesis that NO contributes to the pathogenesis of the initial phase of pulmonary hypertension, 24 rats were exposed to 1 wk hypoxia (10% O₂) in a normobaric hypoxic chamber (22). During the exposure, their drinking water was supplemented either with a nonselective inhibitor of all NOS isoforms, L-NAME (500 mg/l, $n = 8$), or with a selective iNOS inhibitor, L-NIL (8 mg/l, $n = 9$). The treatment with NOS blockers started 3 days before the hypoxic exposure to make sure that effective NOS inhibition had been achieved by the time hypoxia began (Fig. 1). The doses were based on literature data (L-NAME) (45, 54) and our experiment described above (L-NIL). The groups treated with NOS inhibitors were compared with untreated hypoxic (10% O₂, 1 wk; $n = 7$) and normoxic ($n = 8$) controls. In all experiments, the hypoxic chamber was opened for up to 30 min every 2–3 days for cleaning and feeding.

Immediately after termination of the hypoxic exposure, exhaled NO was measured to confirm the effectiveness of NOS inhibition. Each rat was sealed individually in a glass jar (2.1 l) flushed with NO-free air. After 15 min, NO accumulated in the jar was measured with chemiluminescence NO analyzer.

After completing the exhaled NO measurement, we anesthetized the rats (ketamine + xylazine as above). Their carotid artery was cannulated to measure mean SAP. Under oscilloscopic guidance, the pulmonary artery was then catheterized with a thermoplastically shaped polyethylene catheter (1.1 mm outer and 0.75 inner diameter) via a right jugular vein introducer, as previously described (22, 26). After we obtained a stable reading of mean pulmonary arterial pressure (PAP), the rats were intubated via tracheotomy and ventilated with room air at ~60 breaths/min (peak inspiratory pressure 10 cmH₂O, peak expiratory pressure 0 cmH₂O). The chest was opened in midline, and as much as possible extra care was taken to avoid the rats' bleeding. Ascending aorta blood flow was measured with an ultrasonic flow meter (2.5 mm SS-series with J reflector + T106 flow meter; Transonic Systems, Ithaca, NY) as an estimate of cardiac output (20, 42). This value relative to body weight is reported as

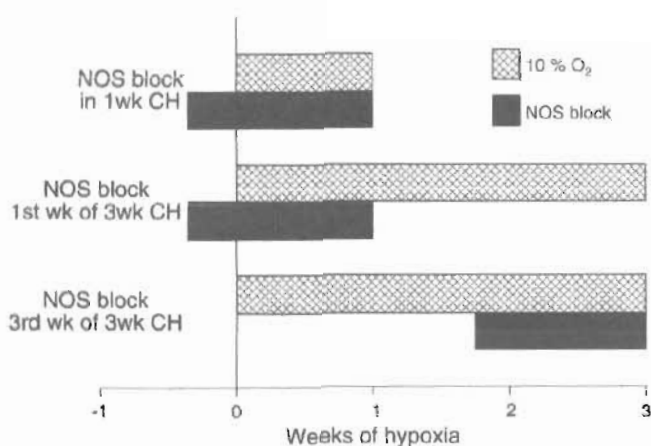


Fig. 1. Schematic of the timing of chronic nitric oxide synthase (NOS) blockade in relation to hypoxic exposure. In one set of experiments, rats received NOS blockers [*N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or L-N^G-([1-iminoethyl]lysine (L-NIL))] just before and during a 1-wk hypoxic exposure (top pair of bars). In another set, the treatment with NOS blockers was the same, but hypoxia continued after cessation of NOS blockade for 2 more wk (middle pair of bars). In the 3rd set, the hypoxic exposure was the same as in the middle set (3 wk), but NOS was blocked only during the last 10 days (bottom pair of bars). Note that the duration of the treatment with the NOS inhibitors was always the same. See METHODS for detailed description. CH, chronic hypoxia.

cardiac index (CI). The values obtained with this method are known to be lower than those *in vivo* due to the anesthesia and especially the thoracotomy; however, this error systematically affects all experimental groups, so that meaningful intergroup comparisons are possible. Finally, the heart was removed, and right ventricle-to-left ventricle plus septum wet weight ratio (RV/LV+S) was used as an index of right ventricular hypertrophy associated with pulmonary hypertension (18).

NOS inhibition during the first week of a 3-wk hypoxia. To test whether the effects of NOS inhibition at the beginning of hypoxia are overcome by continued, prolonged hypoxia after discontinuation of the NOS blockade, an experiment was performed in which three groups of rats were exposed to 3-wk hypoxia (10% O₂) and compared with a normoxic control group ($n = 6$). Of the groups exposed to hypoxia, two received NOS blocker in drinking water (L-NAME 500 mg/l, $n = 7$; or L-NIL 8 mg/l, $n = 8$) for the last 3 days before the hypoxic exposure and during the first week of hypoxia (Fig. 1). The third hypoxic group received no treatment ($n = 8$). We did not observe any differences among the groups in the amount of water consumed. After 3 wk of hypoxia, exhaled NO, SAP, PAP, CI, and RV/LV+S were measured as described above.

NOS inhibition during the last 10 days of a 3-wk hypoxia. This experiment was performed to see whether chronic NOS inhibition starting after pulmonary hypertension has already developed would have effects similar to those seen with NOS inhibition during the first week of hypoxia. Rats were exposed to hypoxia for 3 wk as described above. For the last 10 days of hypoxia, the animals received either L-NIL (8 mg/l, $n = 8$) or L-NAME (500 mg/l, $n = 10$) in their drinking water (Fig. 1). Eight rats exposed to hypoxia received no treatment to serve as controls. Measurements were the same as in the 1-wk hypoxia study (exhaled NO, SAP, PAP, CI, RV/LV+S).

iNOS immunohistochemistry. Rats exposed to hypoxia (10% O₂) for 4 days ($n = 10$) or 20 days ($n = 8$) were compared with nine normoxic controls. After killing the rats by cutting their cervical vertebral column in deep chloral hydrate anesthesia (300 mg/kg body wt ip; Tamba, Olomouc, Czech Republic), we fixed the whole left lung with Baker's fluid and embedded it in paraffin. Slides (4–6 μ m

thick) were stained with hematoxylin and eosin, cresyl fast blue, aldehyde fuchsin, Gomori silver stain, and toluidine blue. After microwave oven antigen retrieval (52), endogenous alkaline phosphatase was inhibited by levamisole, and nonspecific binding was blocked by 10% BSA in Tris-buffered saline. The sections were then incubated for 24 h with monoclonal anti-iNOS antibody (1:25) at room temperature in a humid chamber. Rabbit anti-mouse polyclonal antibody labeled with alkaline phosphatase (1:50) was used as a secondary antibody for 30 min and then visualized with Fast Red TR/Naphthol AS-MX (Sigma FAST tablets). The slides were counterstained with hematoxylin and mounted in gelatin. The primary antibody was omitted in control measurements. Using an image-analyzing software LUCIA General (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic), an observer (J. Uhlík) blinded to the group assignment of the specimens determined separately the percentage of vessels with positive immunostaining for small prealveolar arteries (20–50 μm in diameter), small muscular arteries (50–100 μm), and larger arteries (>100 μm). The slide areas (23–81 mm^2) and the total numbers of vessels per slide (141–498) did not differ significantly among the groups.

Exhaled NO in chronic hypoxia. Evidence is available for increased pulmonary NO production in chronic hypoxia (reviewed in Ref. 23). However, it is unknown whether this increase occurs soon enough to be able to contribute to the radical injury at the beginning of the pulmonary vascular remodeling. To find out, we measured exhaled NO in intact, conscious rats as described in *Inhibition of NOS during 1-wk hypoxia* (15-min collection in 2.1-l jar). The measurements were performed once every 1–2 days during a 26-day exposure to hypoxia (10% O_2) and in subsequent 4 days recovery in room air. To distinguish the contribution of upper airways and lung tissue to the exhaled NO, a supplementary experiment was performed in which normoxic control rats and 4-day hypoxic rats were anesthetized (thiopental 40 mg/kg body wt ip) and intubated via a tracheotomy. NO in their exhaled breath was first measured after placing them for 10 min into the 2.1-l jar, as described above. Because NO production in the nose and paranasal sinuses is known to be very large (14, 39), we expected that NO would diffuse into the jar even in the absence of nasal ventilation. To measure NO production into the exhaled air from the lung tissue and lower airways, the exhalate for NO measurement was then collected directly from the tracheal tube as in the experiments with LPS (see *Dose of L-NIL for long-term, peroral use in rats*).

Nitrotyrosine in lung tissue. To support our hypothesis that increased lung NO production at the beginning of hypoxic exposure contributes to oxidative tissue injury, we used competitive ELISA to

measure 3-nitrotyrosine concentration in soluble extract of lyophilized lung tissue of control and 4-day hypoxic rats. Nitrotyrosine is considered a suitable marker of peroxynitrite production, which originates from a very rapid reaction between NO and superoxide (5). The details of lung tissue preparation and ELISA determination, using our own mouse monoclonal antibody against nitrotyrosine and commercial anti-mouse Ig rabbit antibody conjugated with peroxidase, are described elsewhere (17). Nitrotyrosine concentration was expressed per gram of extracted protein, determined by the bicinchoninic acid method (50).

Statistical analysis. Data were analyzed statistically using StatView 5.0.1 software (SAS Institute, Cary, NC) and presented as means \pm SE. Unpaired *t*-test or one-factor ANOVA followed with Fisher's protected least-significant difference post hoc test were used for group comparisons as appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Because not all measurements were successful in all animals (e.g., bleeding prevented CI measurement in some rats), the actual *n* for each value is given in the figures and tables.

RESULTS

Dose of L-NIL for peroral administration. Before the LPS injection, the concentration of NO in the collected exhalate was close to the detection limit of the chemiluminescence NO analyzer (~ 1 ppb), and no differences among the groups could be discerned (Fig. 2). Exhaled NO did not change 1 h after LPS injection, but it was elevated by 2 h after LPS. In rats that were not treated with any NOS blocker, the exhaled NO continued to rise for the remainder of the experiment (4 h post-LPS) (Fig. 2A). The increase in exhaled NO was blunted by $\sim 50\%$ by 3 mg/l L-NIL. The higher L-NIL dose (8 mg/l) did not have any further inhibitory effect compared with 3 mg/l L-NIL, implying that maximally effective dose was reached (Fig. 2A). L-NAME reduced exhaled NO even more than L-NIL (Fig. 2A). Systolic arterial pressure was significantly elevated by L-NAME treatment (confirming eNOS inhibition), but not by either L-NIL dose (Fig. 2B). This suggests that the maximally effective L-NIL dose against iNOS (8 mg/l) did not cause any measurable nonselective inhibition of eNOS. Because IC_{50} of L-NIL for the third NOS isoform, nNOS (NOS D), is almost $30\times$ higher than that for iNOS (40), we surmised that the dose of L-NIL used in our experiments had no effect on nNOS.

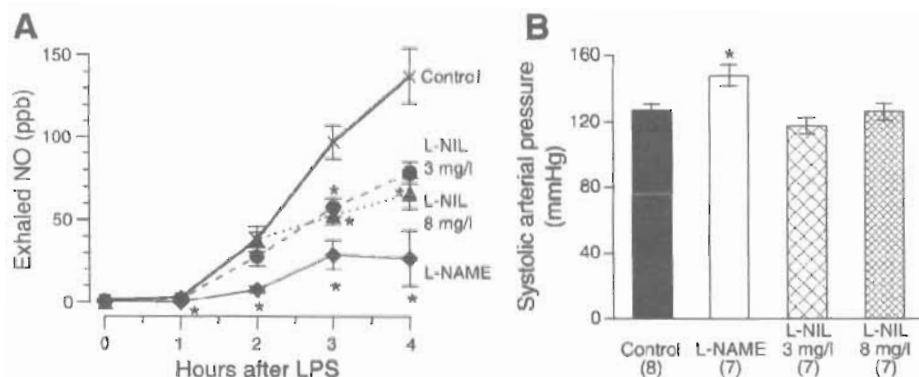


Fig. 2. Selective prolonged inducible NOS (iNOS) inhibition with oral L-NIL. Data are means \pm SE; *ns* for both panels are in the parentheses in B. A: in control rats (not treated with NOS inhibitor), LPS injection elicited a marked, time-dependent rise in NO concentration in exhaled breath. This increase was substantially smaller in rats given 3 mg/l L-NIL in drinking water for 3 days before LPS. A higher L-NIL dose (8 mg/l) did not have any significant additional inhibitory effect, suggesting that a maximally effective dose had been reached. Exhaled NO concentration was reduced the most in rats treated with a nonselective NOS inhibitor, L-NAME (500 mg/l). Note that exhaled NO did not differ between rats treated with L-NAME and the higher L-NIL dose (8 mg/l). B: systolic systemic arterial blood pressure (SAP) measured in awake rats is elevated by the nonselective NOS inhibitor, L-NAME, but not by either of the tested doses of L-NIL, suggesting that L-NIL at these doses does not inhibit endothelial NOS (eNOS). * $P < 0.05$ value differs from the corresponding value in the control group.

Table 1. Body weight, cardiac index, right and left ventricle plus septum wet weight, and their ratio (RV/LV+S) in normoxic and 1-wk hypoxic rats

Group	BW, g	CI, ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	RV, mg	LV+S, mg	RV/LV+S
N	297 ± 6*(8)	101 ± 7 (6)	182 ± 10	604 ± 19*	0.30 ± 0.02 (8)
H 1 wk	227 ± 5 (7)	107 ± 6 (5)	153 ± 7‡	440 ± 8	0.35 ± 0.02 (7)
H 1 wk + L-NAME	223 ± 3 (8)	74 ± 3*(7)	149 ± 9‡	460 ± 7§	0.32 ± 0.02§ (8)
H 1 wk + L-NIL	209 ± 4† (9)	99 ± 15 (3)	160 ± 4	420 ± 14	0.38 ± 0.02‡ (9)

Data are means ± SE, *ns* are in the parentheses. BW, body wt; CI, cardiac index; RV, right ventricle; LV + S, left ventricle plus septum; N, normoxia; H, hypoxia; H 1 wk + L-NAME, rats treated with N^G-nitro-L-arginine methyl ester (500 mg/l) for 3 days before and during a 1-wk exposure to hypoxia; H 1 wk + L-NIL, rats treated with L-N⁶-(1-iminoethyl) lysine (8 mg/l) for 3 days before and during a 1-wk exposure to hypoxia. **P* < 0.05 group differs from all other groups, †*P* < 0.05 group differs from other hypoxic groups, ‡*P* < 0.05 group differs from normoxic group, §*P* < 0.05 group differs from L-NIL-treated group.

Inhibition of NOS during 1-wk hypoxia reduces pulmonary hypertension. As expected, all rats exposed to 1-wk hypoxia had lower body weight than normoxic controls. In addition, the rats treated in hypoxia with L-NIL were slightly but significantly lighter than the remaining hypoxic groups (Table 1). After a 15-min accumulation of exhaled NO, its concentration in a 2.1-l jar was significantly higher in 1-wk hypoxic rats compared with normoxic controls. This hypoxia-induced elevation of exhaled NO was prevented by each of the NOS inhibitors (Fig. 3A). Selectivity of L-NIL was indirectly confirmed by the fact that it did not elevate SAP, unlike the nonselective NOS inhibitor L-NAME (Fig. 3B).

One week of hypoxia was sufficient to significantly elevate PAP compared with normoxic controls (Fig. 3C). In rats treated with the NOS inhibitors during hypoxia, PAP was slightly but significantly lower than in hypoxic controls, albeit still higher than in normoxic controls (Fig. 3C). PAP did not differ between the L-NAME- and L-NIL-treated hypoxic groups. Treatment with L-NAME caused a significant CI reduction (Table 1), as reported previously (20). This was not seen with L-NIL; however, the number of successful CI measurements in this group was low. One week of hypoxia was not sufficient to produce statistically significant right ventricular hypertrophy, and there were no differences among the hypoxic groups in the weight of the right ventricle (Table 1). Probably because of the L-NAME-induced systemic hypertension, the left ventricle plus septum weight was higher in the L-NAME-

than in the L-NIL-treated hypoxic rats, leading to higher RV/LV+S in the latter group (Table 1).

Reduction of pulmonary hypertension by NOS inhibition during the first week of a 3-wk hypoxia. Rats exposed to hypoxia for 3 wk had lower body weight than corresponding controls living in room air (Table 2). At the end of the exposure, NO concentration in the exhaled air was similarly elevated in all hypoxic groups (Fig. 4A). Chronic hypoxic pulmonary hypertension was evident from markedly elevated PAP at the end of 3-wk hypoxic exposure compared with normoxic controls (Fig. 4C). As expected, PAP was higher after 3 wk than after 1 wk of hypoxia. At the end of the 3-wk hypoxic exposure, PAP was higher in untreated, hypoxic controls than in rats treated during the first week of exposure with L-NIL, despite the 2-wk lag from the end of the L-NIL treatment (Fig. 4C). Although the PAP was numerically similar in the L-NAME group to that in the L-NIL group, the difference between the former and the untreated hypoxic controls did not reach statistical significance, perhaps due to the lower number of successful PAP measurements in the L-NAME group. If both NOS blockade groups were pooled, their PAP was significantly lower than that of the untreated hypoxic group (23.1 ± 1.5 vs. 28.1 ± 1.7 mmHg, *P* = 0.026). The groups did not differ in SAP and CI (Fig. 4B and Table 2). Compared with normoxic controls, all hypoxic groups had similarly increased RV/LV+S (Table 2).

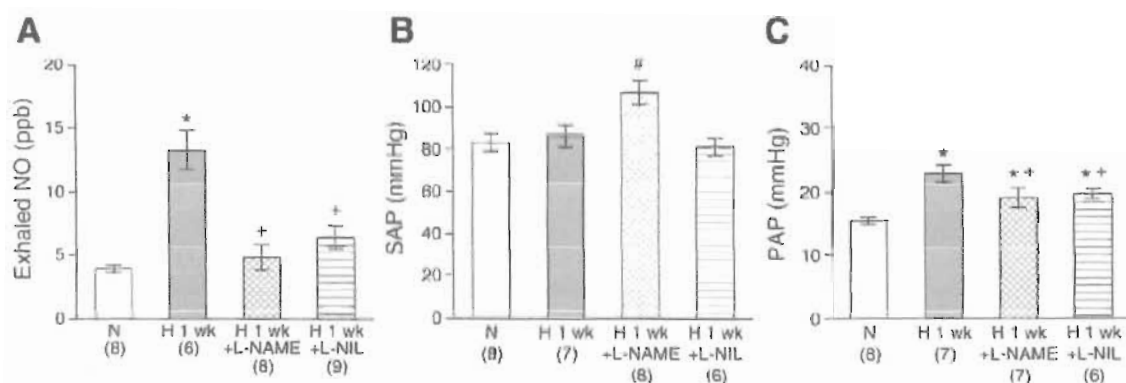


Fig. 3. NOS inhibition during a 1-wk hypoxia reduces pulmonary hypertension. Data are means ± SE, *ns* are in the parentheses. A: elevation of NO concentration in the exhaled air, induced by 1-wk hypoxia, is blocked by both L-NAME and L-NIL treatment, proving their effectiveness. B: mean SAP is elevated by L-NAME, but not L-NIL, treatment, excluding eNOS inhibition by L-NIL. C: increase in mean pulmonary arterial pressure (PAP), induced by 1-wk hypoxia, is blunted by concomitant NOS inhibition. N, rats kept in normoxia; H 1 wk, rats exposed to hypoxia for 1 wk; H 1 wk + L-NAME, rats treated with L-NAME (500 mg/l) for 3 days before and during a 1-wk exposure to hypoxia; H 1 wk + L-NIL, rats treated with L-NIL (8 mg/l) for 3 days before and during a 1-wk exposure to hypoxia. **P* < 0.05 vs. N, +*P* < 0.05 vs. H 1 wk, #*P* < 0.05 vs. all other groups.

Table 2. BW, CI, RV, and LV+S wet weight and their ratio (RV/LV+S) in normoxic rats and rats treated with NOS inhibitors during the 1st week of a 3-week hypoxia

Group	BW, g	CI ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	RV, mg	LV+S, mg	RV/LV+S
N	385 ± 15*(6)	127 ± 15 (6)	183 ± 7*	703 ± 21*	0.26 ± 0.01*(6)
H 3 wk	253 ± 8 (8)	104 ± 5 (7)	285 ± 15	620 ± 23	0.46 ± 0.02 (8)
H 3 wk + L-NAME 1st wk	265 ± 5 (7)	127 ± 12 (4)	275 ± 12	627 ± 17	0.44 ± 0.03 (7)
H 3 wk + L-NIL 1st wk	249 ± 3 (8)	109 ± 13 (8)	238 ± 15†	525 ± 23‡	0.45 ± 0.03 (8)

Data are means ± SE, *ns* are in the parentheses. NOS, nitric oxide synthase; H 3 wk + L-NAME 1st wk, rats treated with L-NAME (500 mg/l) for 3 days before and during the 1st week of a 3-wk hypoxic exposure; H 3 wk + L-NIL 1st wk, rats treated with L-NIL (8 mg/l) for 3 days before and during the 1st week of a 3-wk hypoxic exposure. **P* < 0.01 normoxic group differs from all hypoxic groups, †*P* < 0.05 L-NIL-treated group differs from the untreated hypoxic group, ‡*P* < 0.05 L-NIL-treated group differs from the L-NAME-treated group.

NOS inhibition during the third week of hypoxia has little effect on pulmonary hypertension. Just before the initiation of the NOS blocker treatment, the exhaled NO levels were similarly elevated in all hypoxic groups. At the end of the NOS blockade during the third week of hypoxia, the exhaled NO was markedly reduced by both L-NAME and L-NIL (Fig. 5A).

As expected, SAP was elevated by 1-wk L-NAME administered just before the measurement, whereas L-NIL had no effect on SAP (Fig. 5B). The groups treated with NOS blockers in the last week of hypoxia did not differ significantly in PAP from the untreated hypoxic controls, although there was a tendency for increase in the group given L-NAME and for reduction in the L-NIL group (Fig. 5C). There were no differences among the groups in CI (Table 3).

Surprisingly, both the right ventricle weight and RV/L+S were lower in the group given L-NAME during the last week of hypoxia than in the remaining hypoxic groups (Table 3). We do not have any explanation for this perplexing observation, except perhaps some nonspecific effect of L-NAME (2, 3, 8, 46, 53). Left ventricular weights did not differ between these groups. L-NIL had no effect on the ventricular weights (Table 3).

Hypoxia transiently elevates iNOS expression in lung vessels. Expression of iNOS was not detected in lung sections from control rats living in normoxia (Fig. 6A). By contrast, almost all pulmonary arteries of all sizes showed strong positive iNOS immunostaining after 4 days of hypoxia (Figs. 6B

and 7). The staining was localized predominantly to the smooth muscle layer, although, to a lesser degree, it was detected also in the intima and adventitia. In addition to the vessels, iNOS immunostaining was positive also in the pleura, airway walls, and focally in the interalveolar septa. The positive staining in the pleura and airways was also evident in the lungs of rats kept in hypoxia for 3 wk. However, the iNOS immunostaining in the walls of pulmonary vessels of all sizes was no longer apparent in these animals and did not differ from normoxic controls (Figs. 6C and 7). We observed an increase in the total number of large pulmonary vessels per mm² in the 3-wk hypoxic group (0.70 ± 0.05) compared with both the 4-day hypoxic (0.45 ± 0.06) and control rats (0.42 ± 0.07). There were no statistically significant differences in the numbers of other vessels among the groups.

Exhaled NO increases early in chronic hypoxia. Concentration of NO in exhaled air was low when the animals lived in normoxia but increased markedly on the first day of hypoxic exposure. It continued to rise until day 5, then leveled off, and, despite daily and individual variations, remained essentially stable for the rest of the hypoxic exposure (Fig. 8A). The NO levels started to drop on the first day of room air recovery and approached the normally low values by day 4 of recovery (Fig. 8A). In the supplementary experiment, exhaled NO measured directly from the tracheal tube doubled after 4-day hypoxia compared with the normoxic group (Fig. 8B). The difference between the tracheal tube collection and jar accumulation,

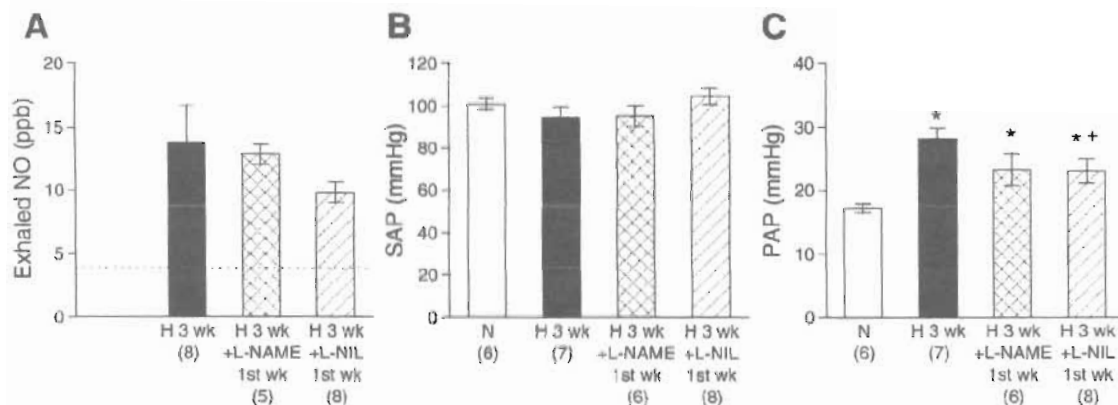


Fig. 4. NOS inhibition during the 1st wk of a 3-wk hypoxia reduces pulmonary hypertension. Data are means ± SE, *ns* are in the parentheses. A: 2 wk after cessation of NOS blockade there are no significant differences in exhaled NO levels among hypoxic animals. The dotted horizontal line indicates the level in normoxic controls from Fig. 3A. B: 2 wk after cessation of NOS blockade there are no significant differences in SAP. C: increase in PAP, induced by 3-wk hypoxia, is smaller in rats treated with L-NIL at the beginning of the exposure. H 3 wk, rats exposed to hypoxia for 3 wk; H 3 wk + L-NAME 1st wk, rats exposed to hypoxia for 3 wk and treated with L-NAME (500 mg/l) for 3 days before and during the 1st week of the exposure; H 3 wk + L-NIL 1st wk, rats exposed to hypoxia for 3 wk and treated with L-NIL (8 mg/l) for 3 days before and during the 1st week of the exposure. **P* < 0.05 vs. N, ***P* < 0.05 vs. H 3 wk.

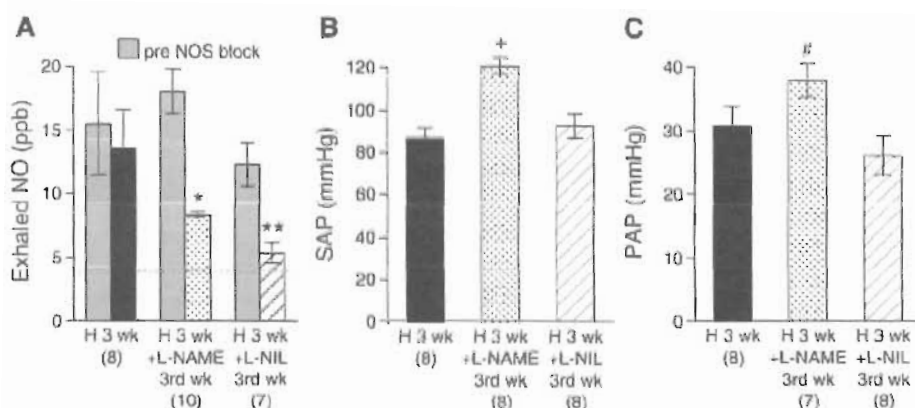


Fig. 5. NOS inhibition during the last 10 days of a 3-wk hypoxia. Data are means \pm SE, *n*s are in the parentheses. A: in 3 groups exposed to hypoxia, NO concentration in exhaled air was similar before the initiation of NOS blockade after 2 wk of hypoxia and decreased significantly after 10 days of L-NIL or L-NAME treatment. The dotted horizontal line indicates the level in normoxic controls from Fig. 3A. B: SAP in rats kept in hypoxia for 3 wk was increased by L-NAME treatment during the last 10 days before the measurement. L-NIL had no effect. C: PAP, elevated by 3 wk of hypoxia, was not significantly reduced by NOS inhibition during the last 10 days of the exposure. H 3 wk + L-NAME 3rd wk, rats exposed to 3-wk hypoxia and treated with L-NAME (500 mg/l) during the last 10 days; H 3 wk + L-NIL 3rd wk, rats exposed to 3-wk hypoxia and treated with L-NIL (8 mg/l) during the last 10 days. * $P < 0.0005$ vs. pre NOS block, ** $P < 0.05$ vs. pre NOS block, + $P < 0.05$ vs. all other groups, # $P < 0.05$ vs. H 3 wk + L-NIL 3rd wk.

reflecting the contribution of the upper airways, did not differ between the hypoxic and normoxic groups (Fig. 8B), indicating that the source of the elevated NO exhalation in hypoxia is the lower respiratory tract. Although the contribution of the upper airways remains remarkable, it does not rise in hypoxia.

Nitrotyrosine concentration in the lungs is elevated after 4 days of hypoxia. The concentration of nitrotyrosine was higher ($P = 0.023$) in extracts from lung tissue of rats exposed to hypoxia for 4 days ($1,065 \pm 96$ nmol/g of extracted protein; $n = 6$) than in extracts from control lungs (791 ± 57 nmol/g; $n = 8$). This implies greater exposure to peroxynitrite, the product of reaction of NO with superoxide (5). Increased nitrotyrosine levels in lung tissue after 4 days of hypoxia was also confirmed by immunoblot analysis (data not shown).

DISCUSSION

This study shows that increased NO production in (or near) the pulmonary vascular wall during the first days of hypoxia, mostly by the iNOS isoform, contributes to the initiation of a process that eventually results in pulmonary hypertension. Of our results, especially the following support this conclusion: the PAP rise in the initial days of hypoxic exposure was partly inhibited by concomitant NOS inhibition. In this regard, selective iNOS inhibitor was as effective as the nonselective blocker of all NOS isoforms. If iNOS blockade was then discontinued and the hypoxic exposure continued, the pulmonary hypertension did not completely "catch up"; it was still reduced at the

end of a 3-wk hypoxia. On the other hand, 10 days' treatment with NOS inhibitors, started after the hypoxic pulmonary hypertension had already developed, did not have significant effect on PAP. The role of iNOS in the first days of hypoxia is further supported by the finding of markedly and transiently elevated expression of iNOS in lung vessels on the fourth day of hypoxia. Our exhaled NO data document the elevated lung NO production at the very onset of hypoxia.

NO is best known for its marked vasodilator activity. As such, exogenous NO is useful in clinical management of acute pulmonary hypertensive crises (for review, see e.g., Ref. 19). However, NO is also a reactive radical capable of tissue injury either directly or after reacting with other radicals. For example, an extremely fast reaction of NO with superoxide yields a highly cytotoxic peroxynitrite (5). There is evidence that oxidative injury of the pulmonary vascular wall at the beginning of hypoxia initiates the process of vascular remodeling that eventually results in pulmonary hypertension (28, 35). Our present data show that endogenous NO affects the initial development of chronic hypoxic pulmonary hypertension. The vasodilator and antiproliferative properties of NO do not prevail at this initial phase because otherwise the NOS inhibitors would have to aggravate, rather than reduce, pulmonary hypertension. The conclusion that increased NO production by iNOS at the initial stage of hypoxia promotes the development of pulmonary hypertension by contributing to oxidative vascular wall injury is supported by our observation of increased

Table 3. BW, CI, RV and LV+S wet weight and their ratio (RV/LV+S) in rats treated with NOS inhibitors during the last week of a 3-wk hypoxia

Group	BW, g	CI, ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	RV, mg	LV+S, mg	RV/LV+S
H 3 wk	253 \pm 5 (8)	81 \pm 6 (7)	269 \pm 18	531 \pm 18	0.51 \pm 0.02 (8)
H 3 wk + L-NAME 3rd wk	265 \pm 4* (10)	97 \pm 9 (5)	214 \pm 9**†	551 \pm 22	0.39 \pm 0.02**† (10)
H 3 wk + L-NIL 3rd wk	247 \pm 6 (8)	97 \pm 15 (6)	275 \pm 14	509 \pm 8	0.54 \pm 0.02 (8)

Data are means \pm SE, *n*s are in the parentheses. H 3 wk + L-NAME 3rd wk, rats treated with L-NAME (500 mg/l) during the last week of a 3-wk hypoxic exposure; H 3 wk + L-NIL 3rd wk, rats treated with L-NIL (8 mg/l) during the last week of a 3-wk hypoxic exposure. * $P < 0.05$ group treated with L-NAME differs from L-NIL-treated group, † $P < 0.05$ group treated with L-NAME differs from untreated hypoxic group.

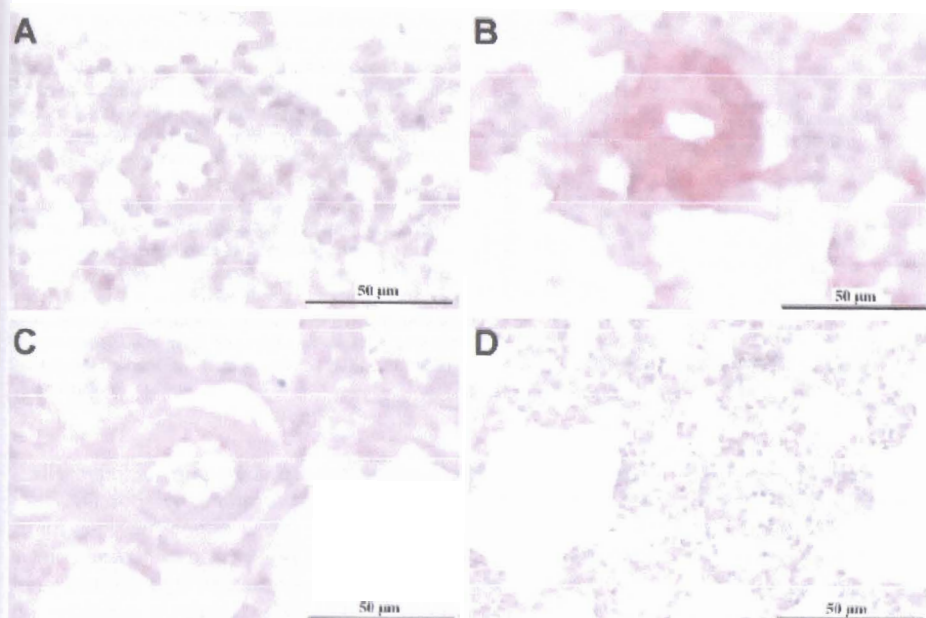


Fig. 6. Transient elevation of iNOS immunostaining in pulmonary vessels at the beginning of CH. *A*: small prealveolar arteriole from a normoxic rat showing relatively thin wall, single elastic lamina and negative iNOS immunostaining. *B*: small prealveolar arteriole from a rat exposed to hypoxia for 4 days demonstrating distinct wall thickening and strongly positive iNOS immunostaining. *C*: small prealveolar arteriole from a rat exposed to hypoxia for 20 days showing wall thickening, double elastic laminae, and negative iNOS immunostaining. *D*: small prealveolar arteriole from a rat exposed to hypoxia for 4 days with primary antibody omitted (negative control). Original magnification was $\times 40$ in all panels, and the scale bars represent 50 μm .

lung tissue levels of peroxynitrite marker, nitrotyrosine, after 4 days of hypoxia. Further support is provided by our previous finding that serum levels of nitrotyrosine are elevated after 4 days of hypoxia but normalized at the end of a 3-wk exposure (27). Consistently elevated lung nitrotyrosine was reported in human patients with pulmonary hypertension (7).

Because our conclusions rely to a large extent on the L-NIL selectivity for iNOS, it was necessary first to determine an effective and selective L-NIL dose for chronic peroral administration. The effectiveness of various L-NIL doses in inhibiting NO production was assessed by measurements of exhaled NO levels after a challenge with a well-known iNOS inducer, LPS (41), whereas selectivity toward iNOS rather than eNOS was inferred from the absence of an effect on SAP. L-NIL at 8 mg/l in drinking water markedly reduced exhaled NO levels after LPS, albeit not as much as the nonselective NOS blocker, L-NAME, at 500 mg/l. This is consistent with reports that, in addition to iNOS induction, LPS treatment can increase expression of the remaining NOS isoforms (12, 24, 30, 32). Somewhat surprisingly, even the high L-NAME dose used did

not prevent the rise in exhaled NO after LPS completely. It is possible that some of the NO is formed in compartments not well accessible from the circulation. For example, macrophages could encounter LPS in the bloodstream, begin the process of iNOS induction, and then leave the vessels toward alveolar spaces, where the penetration of L-NAME may be limited.

The reduction in PAP by NOS inhibition during the first week of hypoxia was not accompanied by a corresponding mitigation of right ventricular hypertrophy. Enlargement of the right ventricle in chronic hypoxia is a recognized consequence of PAP elevation. However, several studies suggest that right ventricular weight and PAP must not always be closely tied. For example, various treatments of experimental pulmonary hypertension reduced right ventricular hypertrophy less (and at higher doses) than PAP (56, 57). Chronic pulmonary hypertension can be elicited experimentally without an accompanying right ventricular hypertrophy (10). Right ventricular weight was reported to rise in proportion to PAP elevation in rats exposed to chronic intermittent hypoxia from fourth day of age, but no significant correlation could be detected in older animals (34). Thus it is quite likely that chronic hypoxia has other effects on the ventricular size in addition to those mediated by increased PAP. This possibility is supported by observations that left ventricle can also be somewhat enlarged (relative to body weight) in chronic hypoxia (34, 43). Because NO has antiproliferative effects, it is also possible that NOS inhibition causes some degree of heart enlargement that may offset the reducing effect of the lessened afterload. This possibility is strongly supported by our earlier observation that chronic L-NAME treatment in normoxia enlarges both ventricles (20).

The effects of NOS inhibition on chronic hypoxic pulmonary hypertension have been studied previously, but not specifically at the initial stage of the exposure. Numerous studies demonstrated that acutely applied, nonselective NOS inhibitors cause considerably greater vasoconstriction in lungs of chron-

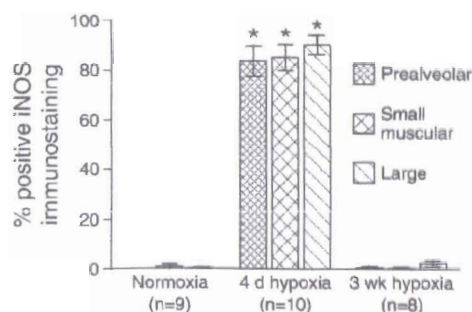
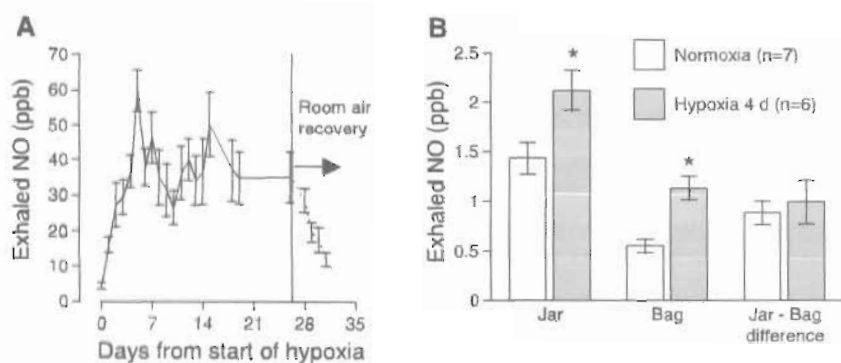


Fig. 7. Transient elevation of iNOS immunostaining in pulmonary vessels at the beginning of CH. Percentage (means \pm SE) of prealveolar, small muscular, and large pulmonary vessels showing iNOS immunostaining in normoxia, after 4 days of hypoxia, and after 3 wk of hypoxia. d, Days. * $P < 0.0001$ vs. the other groups.

Fig. 8. Concentration of NO in exhaled breath increases at the very beginning of CH exposure. **A:** accumulation of breath NO during a 15-min stay of awake rats in a closed jar ($n = 8$ in the 1st wk, 5 thereafter) is negligible before exposure to CH but is significantly increased on the 1st day of exposure, remains elevated throughout a 3-wk hypoxia, and drops toward minimal, control level within days of normoxic recovery. All data points in hypoxia differ significantly from day 0. **B:** total exhaled NO, measured as 10-min accumulation in a closed jar, is higher in 4-day hypoxic rats than in normoxic controls, as is the contribution from lower airways, estimated from breath collection into a small bag through tracheal tube. The difference between these 2 measurements, corresponding to the contribution from the upper airways, is large but unchanged by hypoxia. Data are means \pm SE. * $P < 0.05$ vs. normoxia.



ically hypoxic compared with normoxic rats, implying elevated lung NO activity in chronic hypoxia (for review, see Ref. 23). In an apparent contrast, rats given L-NAME during the entire 3-wk hypoxic exposure did not have more severe pulmonary hypertension than rats exposed to the same hypoxia, but with no inhibitor treatment (20). Our current results offer one possible interpretation of that paradox. It could be a combination of a sustained reduction of pulmonary hypertension by iNOS blockade in the first week (Fig. 3D) counteracted by augmentation of pulmonary hypertension by inhibition of elevated eNOS activity in the more advanced phase of the hypoxic exposure.

There are also studies of chronic administration of selective iNOS inhibitors (L-NIL and aminoguanidine) during the entire 3- to 4-wk hypoxic exposure, showing no effect on pulmonary hypertension (48, 55). In our study, iNOS blockade during the first week of hypoxia reduced pulmonary hypertension. A possible explanation of this discrepancy could be the fact that we started the administration of NOS blockers 3 days before hypoxic exposure to make sure that their blood and tissue levels were at effective levels at the moment of the onset of hypoxia. It is thus possible that the role of iNOS in vascular wall injury promoting pulmonary hypertension is confined to the very beginning of hypoxia. In addition, ours is the only study demonstrating the selective effectiveness of the iNOS blocker at the dose and route of administration used.

As far as we know, this is the first description of a chronic, peroral use of L-NIL for selective iNOS inhibition *in vivo*. Continuous infusion or repeated injections of L-NIL were reported previously (48, 49); however, our method of adding L-NIL to drinking water is much more practical. It has a possible disadvantage of variations in water consumption. This is especially important at the beginning of hypoxia, which is typically associated with reduced drinking. However, in our study the L-NIL intake in 1-wk hypoxia was sufficient, as evidenced by the suppression of exhaled NO to the low level similar to that in normoxic controls (Fig. 3A). Furthermore, the exhaled NO was similar after L-NIL treatment in 1-wk hypoxia and at the end of a 3-wk hypoxia, when water intake is known to be normalized (Fig. 5A).

Many authors have reported elevated NOS mRNA and protein in lungs and pulmonary vessels in chronic hypoxia (for review, see Ref. 23). Most of those studies either focused on eNOS or did not discriminate between NOS isoforms. Several studies show elevated iNOS mRNA or protein at the end of a

prolonged hypoxia (2–4 wk) in whole lung homogenates (16, 29, 36, 44, 48). We are aware of two publications that focus on lung iNOS expression during the first week of hypoxia (51, 59); using rats, both show increased iNOS protein in whole lung homogenates. Our present data further supplement this information by showing that the iNOS induction in the first days of hypoxia is localized to a major extent in the pulmonary vessels, especially their media (Fig. 6). Furthermore, our data indicate that with prolonged hypoxia, iNOS remains expressed in airway epithelia, but its expression in the pulmonary vascular wall returns to the barely detectable baseline level. Thus it appears that the chronic hypoxia-induced elevation of whole lung iNOS protein in some (29, 36) but not all (16) studies can be attributed to the extravascular iNOS expression. Together, our data are consistent with the reports of others and with the hypothesis that the pulmonary vascular wall iNOS expression rises during the first few days of hypoxia and returns towards baseline thereafter.

Enhanced iNOS expression not accompanied by NO overproduction has been occasionally reported (9, 13, 37). Thus to support our hypothesis of a causative role of elevated NO in the initiation of hypoxic pulmonary hypertension, it was necessary not only to show early iNOS induction in lung vessels (Figs. 6 and 7), but also to prove that NO synthesis actually rises rapidly after the onset of hypoxia. Elevated pulmonary NO production in prolonged hypoxia has been reported previously (for review, see Ref. 23). High-altitude residents have higher exhaled NO compared with lowlanders (4). However, changes in NO production during the first days of hypoxia have not been studied. We show rapidly rising NO production into the exhaled air in the first days of hypoxia (Fig. 8A). Although this measurement is relatively easy to perform, its main limitation is ambiguity in respect to the source of the detected NO. It has been demonstrated that a major source of exhaled NO are the upper airways, especially the nasal and paranasal cavities (14, 39). Therefore, we performed a supplementary experiment to show that while the majority of NO in exhaled air comes from upper airways both in normoxia and hypoxia, the respiratory tract below the level of the trachea is responsible for the increase in exhaled NO seen in the first days of hypoxia (Fig. 8B). Furthermore, our data show that most of the exhaled NO increase in hypoxia is attributable to iNOS, as it was similarly and almost completely inhibited by L-NAME and L-NIL, both at the beginning of hypoxia (Fig. 3A) and after a more pro-

longed exposure (Fig. 5A). In normoxia, almost all exhaled NO is derived from eNOS (58).

The measurement of NO accumulation in an airtight container is a simple method for checking NO production in an intact, awake rat. Although we use it as an indicator of lung NO production, other possible NO sources, such as colonic denitrification bacteria or acidic nitrate reduction in the stomach, should be considered. However, the hypoxia-induced elevation of exhaled NO was completely prevented by each of the NOS inhibitors, implying that the collected NO was mostly exhaled since the alternative NO sources are NOS independent (38).

Although our data prove iNOS involvement in the initial phase of the development of hypoxic pulmonary hypertension, they do not show whether iNOS induction is a cause or a consequence of injury to the pulmonary vessels that underlies their remodeling. It is possible that the aggravating influence of NO on the initial phase of pulmonary hypertension can contribute to the findings that inhaled NO does not improve long-term outcome in acute respiratory distress syndrome (31) and in persistent pulmonary hypertension of the newborn (11, 33). The most clinically relevant correlate to our experimental situation are probably acute exacerbations of chronic hypoxic conditions. Our data suggest that in these situations, adding even more NO (by inhalational therapy) may have drawbacks. This issue should also be considered in attempts to treat high-altitude pulmonary edema with inhaled NO (1).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Ludek Cervenka for invaluable help with systolic arterial pressure measurements in awake rats, to Dr. Ludek Vajner for involvement in the histochemical evaluation, to Dr. Richard Vytasek for performing peroxynitrite ELISA, to Michal Snorek and Petr Zdaril for assistance with exhaled NO measurements in awake rats, and to Kveta Vencliková for general technical and logistical support.

GRANTS

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic Grant 305/05/0672.

REFERENCES

- Anand IS, Prasad BA, Chugh SS, Rao KR, Cornfield DN, Milla CE, Singh N, Singh S, and Selvamurthy W. Effects of inhaled nitric oxide and oxygen in high-altitude pulmonary edema. *Circulation* 98: 2441-2445, 1998.
- Archer SL and Hampf V. N^G -monomethyl-L-arginine causes nitric oxide synthesis in isolated arterial rings: trouble in paradise. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 590-596, 1992.
- Babál P, Pecháňová O, and Bernátová I. Long-term administration of D-NAME induces hemodynamic and structural changes in the cardiovascular system. *Physiol Res* 49: 47-54, 2000.
- Beall C, Laskowski D, Strohl K, Soria R, Villena M, Vargas E, Alarcon A, Gonzales C, and Erzurum S. Pulmonary nitric oxide in mountain dwellers. *Nature* 414: 411-412, 2001.
- Beckman JS and Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol Cell Physiol* 271: C1424-C1437, 1996.
- Bíbová J, Miková D, Baňasová A, Hampf V, and Herget J. Inducible nitric oxide synthase participates in the mechanism of chronic hypoxic pulmonary hypertension (Abstract). *Physiol Res* 51: 71P, 2002.
- Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tudor RM, Hopken MW, Flores SC, and Voelkel NF. Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 764-769, 2004.
- Buxton ILO, Cheek DJ, Eckman D, Westfall DP, Sanders KM, and Keef KD. N^G -nitro-L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. *Circ Res* 72: 387-395, 1993.
- Cadogan E, Hopkins N, Giles S, Bannigan JG, Moynihan J, and McLoughlin P. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase without vasodilator effect in chronically infected lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 277: L616-L627, 1999.
- Chen LW, Chen CF, and Lai YL. Chronic activation of neurokinin-1 receptor induces pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: H1543-H1551, 1999.
- Clark RH, Kueser TJ, Walker MW, Southgate WM, Huckaby JL, Perez JA, Roy BJ, Keszler M, Kinsella JP; Clinical Inhaled Nitric Oxide Research Group. Low-dose nitric oxide therapy for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *N Engl J Med* 342: 469-474, 2000.
- Comtois AS, El-Dwalri Q, Laubach VE, and Hussain SNA. Lipopolysaccharide-induced diaphragmatic contractile dysfunction in mice lacking the inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1975-1980, 1999.
- Cucchiari G, Tatum AH, Brown MC, Camporesi EM, Daucher JW, and Hakim TS. Inducible nitric oxide synthase in the lung and exhaled nitric oxide after hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 277: L636-L644, 1999.
- Dillon WC, Hampf V, Shultz PJ, Rubins JB, and Archer SL. Origins of breath nitric oxide in humans. *Chest* 110: 930-938, 1996.
- Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt AY, Large SR, Wells FC, and Wallwork J. Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 324: 1539-1547, 1991.
- Fagan KA, Morrissey B, Fouty BW, Sato K, Harral JW, Morris KG, Hoedt-Miller M, Vidmar S, McMurtry IF, and Rodman DM. Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir Res* 2: 306-313, 2001.
- Flšárková B, Vytásek R, Miková D, and Vízek M. Hyperoxia attenuated nitrotyrosine concentration in the lung tissue of rats with experimental pneumonia. *Physiol Res* 53: 487-492, 2004.
- Fulton RM, Hutchinson EC, and Jones AM. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J* 14: 413-420, 1952.
- Gianetti J, Bevilacqua S, and De Caterina R. Inhaled nitric oxide: more than a selective pulmonary vasodilator. *Eur J Clin Invest* 32: 628-635, 2002.
- Hampf V, Archer SL, Nelson DP, and Weir EK. Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 75: 1748-1757, 1993.
- Hampf V, Bíbová J, Miková D, Baňasová A, and Herget J. Prolonged, selective inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in intact rats by addition of L-N^G-(1-iminoethyl)lysine (L-NIL) to drinking water (Abstract). *Nitric Oxide* 6: 398-399, 2002.
- Hampf V and Herget J. Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* 142: 619-624, 1990.
- Hampf V and Herget J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* 80: 1337-1372, 2000.
- Harada S, Imaki T, Chikada N, Naruse M, and Demura H. Distinct distribution and time-course changes in neuronal nitric oxide synthase and inducible NOS in the paraventricular nucleus following lipopolysaccharide injection. *Brain Res* 821: 322-332, 1999.
- Heller J and Hellerová S. Long-term effect on blood pressure of early brief treatment by different antihypertensive agents: a study in the Prague hypertensive rat. *Kidney Blood Press Res* 21: 445-451, 1998.
- Herget J and Paleček F. Pulmonary arterial blood pressure in closed chest rats. Changes after catecholamines, histamine and serotonin. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 198: 107-117, 1972.
- Herget J, Wilhelm J, Novotná J, Eckhardt A, Vytásek R, Mrázková L, and Ošťádal M. A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res* 49: 493-501, 2000.
- Hoshikawa Y, Ono S, Suzuki S, Tanita T, Chida M, Song C, Noda M, Tabata T, Voelkel NF, and Fujimura S. Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J Appl Physiol* 90: 1299-1306, 2001.
- Igari H, Tatsumi K, Sugito K, Kasahara Y, Saito M, Tani T, Kimura H, and Kuriyama T. Role of EDRF in pulmonary circulation during sustained hypoxia. *J Cardiovasc Pharmacol* 31: 299-305, 1998.
- Iwase K, Miyazaki K, Shimizu A, Nagasaki A, Gotoh T, Mori M, and Takiguchi M. Induction of endothelial nitric-oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment. *J Biol Chem* 275: 11929-11933, 2000.

31. Kaisers U, Busch T, Deja M, Donaubaue B, and Falke K. Selective pulmonary vasodilation in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 31: S337-S342, 2003.
32. Kang WS, Tamarkin FJ, Wheeler MA, and Weiss RM. Rapid up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase in a mouse model of Escherichia coli lipopolysaccharide-induced bladder inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 452-458, 2004.
33. Kinsella JP, Walsh WF, Bose CL, Gerstmann DR, Labella JJ, Sardesai S, Walsh-Sukys MC, McCaffrey MJ, Cornfield DN, Bhutani VK, Cutter GR, Baier M, and Abman SH. Inhaled nitric oxide in premature neonates with severe hypoxaemic respiratory failure: a randomised controlled trial. *Lancet* 354: 1061-1065, 1999.
34. Kolář F, Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V, and Widimský J. Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats. *Respiration* 56: 57-62, 1989.
35. Lachmanová V, Hnilčíková O, Povýšilová V, Hampl V, and Herget J. N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sci* 77: 175-182, 2005.
36. Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A, and Johns RA. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 270: L164-L170, 1996.
37. Lovchik J, Lipscomb M, and Lyons C. Expression of lung inducible nitric oxide synthase protein does not correlate with nitric oxide production in vivo in a pulmonary immune response against Cryptococcus neoformans. *J Immunol* 158: 1772-1778, 1997.
38. Lundberg J, Weitzberg E, Lundberg J, and Alving K. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 35: 1543-1546, 1994.
39. Lundberg JON, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lindholm J, Ånggård A, Hökfelt T, Lundberg JM, and Alving K. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nat Med* 1: 370-373, 1995.
40. Moore WM, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, and Currie MG. L-N^G-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 37: 3886-3888, 1994.
41. Nathan C and Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269: 13725-13728, 1994.
42. Novotná J, Bíbová J, Hampl V, Deyl Z, and Herget J. Hyperoxia and recovery from hypoxia alter collagen in peripheral pulmonary arteries similarly. *Physiol Res* 50: 153-163, 2001.
43. Ošťádal B, Miřejovská E, Hurych J, Pelouch V, and Procházka J. Effect of intermittent high altitude hypoxia on the synthesis of collagenous and noncollagenous proteins of the right and left ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 12: 303-308, 1978.
44. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, and Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274: L212-L219, 1998.
45. Pecháňová O and Bernátová I. Effect of long-term NO synthase inhibition on cyclic nucleotide content in rat tissues. *Physiol Res* 45: 305-309, 1996.
46. Peterson DA, Peterson DC, Archer S, and Weir EK. The non specificity of specific nitric oxide synthase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 797-801, 1992.
47. Rees DD, Palmer RMJ, and Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3375-3378, 1989.
48. Resta TC, O'Donoghue TL, Earley S, Chicoine LG, and Walker BR. Unaltered vasoconstrictor responsiveness after iNOS inhibition in lungs from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 276: L122-L130, 1999.
49. Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson CB, and Blantz RC. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest* 100: 439-448, 1997.
50. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985.
51. Teng X, Li D, Catravas JD, and Johns RA. C/EBP- β mediates iNOS induction by hypoxia in rat pulmonary microvascular smooth muscle cells. *Circ Res* 90: 125-127, 2002.
52. Thomas P, Khokha R, Shepherd F, Feld R, and Tsao M. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 190: 150-156, 2000.
53. Tseng CM, Goodman LW, Rubin LJ, and Tod ML. N^G-monomethyl-L-arginine paradoxically relaxes precontracted canine intrapulmonary arteries. *J Appl Physiol* 74: 549-558, 1993.
54. Tucker E, Ledingham J, Zheng Y, and Laverty R. Effects of chronic inhibition of nitric oxide synthase in the genetically hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27: 647-649, 2000.
55. Tyler RC, Muramatsu M, Abman SH, Stelzner TJ, Rodman DM, Bloch KD, and McMurtry IF. Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 276: L297-L303, 1999.
56. Underwood DC, Bochnowicz S, Osborn RR, Loudon CS, Hart TK, Ohlstein EH, and Hay DW. Chronic hypoxia-induced cardiopulmonary changes in three rat strains: inhibition by the endothelin receptor antagonist SB 217242. *J Cardiovasc Pharmacol* 31: S453-S455, 1998.
57. Underwood DC, Bochnowicz S, Osborn RR, Luttmann MA, and Hay DWP. Nonpeptide endothelin receptor antagonists. X. Inhibition of endothelin-1- and hypoxia-induced pulmonary pressor responses in the guinea pig by the endothelin receptor antagonist, SB 217242. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 1130-1137, 1997.
58. Vaughan DJ, Brogan TV, Kerr ME, Deem S, Luchtel DL, and Swenson ER. Contributions of nitric oxide synthase isozymes to exhaled nitric oxide and hypoxic pulmonary vasoconstriction in rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L834-L843, 2003.
59. Xue C and Johns RA. Upregulation of nitric oxide synthase correlates temporally with onset of pulmonary vascular remodeling in the hypoxic rat. *Hypertension* 28: 743-753, 1996.

PŘÍLOHA B

Prevention of Mast Cell Degranulation by Disodium Cromoglycate Attenuates the Development of Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats Exposed to Chronic Hypoxia

Alena Baňasová^{a,e} Hana Maxová^{b,e} Václav Hampel^{a,e} Martin Vízek^{b,e}
Viera Povýšilová^{c,e} Jana Novotná^{d,e} Olga Vajnerová^{a,e} Olga Hnilíčková^{a,e}
Jan Herget^{a,e}

Departments of ^aPhysiology, ^bPathological Physiology, ^cPathology and Molecular Medicine, and
^dMedical Chemistry and Biochemistry, Charles University Second Medical School Prague, and
^eCardiovascular Research Centre, Prague, Czech Republic

© S. Karger AG, Basel
**PROOF Copy
for personal
use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

Key Words

Hypoxic pulmonary hypertension · Disodium cromoglycate · Mast cell · Pulmonary vascular remodeling · Matrix metalloproteinases

Abstract

Background: Chronic hypoxia induces lung vascular remodeling, which results in pulmonary hypertension. Vascular remodeling is associated with collagenolysis and activation of matrix metalloproteinases (MMPs). One of the possible sources of MMPs in hypoxic lung are mast cells. **Objective:** The role of lung mast cell collagenolytic activity in hypoxic pulmonary hypertension was tested by the inhibitor of mast cell degranulation disodium cromoglycate (DSCG). **Methods:** Rats were treated with DSCG in an early or later phase of isobaric hypoxia. Control groups were exposed to hypoxia only or to normoxia. Lung hemodynamics, muscularization and collagen metabolism in the walls of peripheral pulmonary vessels in the lungs were measured. **Results:** DSCG applied at an early phase of exposure to hypoxia reduced the development of pulmonary hypertension, inhibited muscu-

larization in peripheral pulmonary arteries and decreased the amount of collagen cleavage fragments in prealveolar vessels. **Conclusions:** Mast cell degranulation plays a role in the initiation of hypoxic pulmonary vascular remodeling.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Introduction

Chronic hypoxia results in hypoxic pulmonary hypertension (HPH) characterized by fibrillation and muscularization of the walls of peripheral pulmonary arteries. The beginning of vascular remodeling is associated with increased collagen turnover due to elevated formation and activation of specific matrix metalloproteinases (MMPs) [1]. Their activity results in the deposition of low molecular weight fragments of collagen in the vessel wall [2]. These fragments (matrikines) then stimulate the proliferation of vascular smooth muscle cells and fibroblasts [3]. The increased collagenolytic activity is one of the causative factors in the pathogenesis of HPH since MMP inhibition by administration of their specific inhibitor,

KARGER.

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel.
0025-7931/07/0000-8000\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/res

Jan Herget
Department of Physiology, Charles University Second Medical School Prague
Přízeňská 130/221
150 00 Prague 5 (Czech Republic)
Tel. +420 257 296 200, Fax +420 257 210 995, E-Mail jan.herget@fmotol.cuni.cz

batimastat, markedly attenuated the development of HPH and partly prevented the thickening of walls of peripheral pulmonary arteries [4].

One of the possible sources of MMPs in hypoxic lungs are mast cells. Lung mast cells (LMCs) concentrate at the onset of hypoxic exposure close to the walls of prealveolar vessels and increase the formation of proteases including collagen-cleaving MMP-13 [5]. Moreover, MMP-13 (rodent-type interstitial collagenase), which plays a crucial role in cleaving native collagen, is produced by mast cells isolated from rat lungs exposed to hypoxia *in vitro* [6].

All these data support the hypothesis that LMC-derived MMPs play a role in the pathogenesis of HPH. Therefore, this study was designed to test whether administration of disodium cromoglycate (DSCG) – a drug that blocks LMC degranulation and may therefore inhibit the MMP release – will affect the development of HPH.

Material and Methods

Study Design

Four groups of adult male Wistar rats (Anlab, Prague, Czech Republic) were used. Experiments were performed in accordance with the European Community and NIH guidelines for using experimental animals. All procedures were approved by the Animal Studies Committee of our institution.

Three groups of rats were placed in an isobaric hypoxic chamber (F_{iO_2} 0.1) [7] for a period of 4 days or 3 weeks. In 2 groups exposed to hypoxia, DSCG (40 mg/kg b.w. i.p. once a day; cromolyn sodium salt, Sigma Aldrich, Prague, Czech Republic) was administered either at an early phase of exposure to chronic hypoxia (first 4 days, group DSCG + H, $n = 13$) or at a later phase (last 4 days, group H + DSCG, $n = 8$). The third hypoxic group was untreated (group H, $n = 13$). The normoxic group that served as control (group N, $n = 13$) was kept in air. Two studies were performed.

Hemodynamic Measurements

After 3 weeks of hypoxic or normoxic exposure in animals of the N ($n = 8$), H ($n = 8$), H + DSCG ($n = 8$) and DSCG + H ($n = 8$) groups, pulmonary arterial blood pressure (PAP, mm Hg) was recorded in rats anesthetized with thiopental (40 mg/kg b.w. i.p.; ICN Czech Republic, Roztoky, Czech Republic) and spontaneously breathing room air, using a catheter inserted in the pulmonary artery via the right jugular vein [4, 8]. Systemic arterial blood pressure (mm Hg) was measured in the cannulated left carotid artery. Cardiac output (ml/min) was estimated by ultrasonic flow probe placed at the ascending aorta after opening the chest under mechanical ventilation with room air [9]. After the measurements of hemodynamics, the heart and lungs were removed from the chest. The right heart ventricle (RV) and the left ventricle plus septum (LV + S) were separated and weighted. The lungs were filled with formal solution through the trachea and stored in formal for 4 weeks. Lung sections were then stained by the hema-

toxylin resorcin-fuchsin method, and the percentage of double-laminated peripheral vessels was counted as described previously [4, 10].

Collagen Composition of the Walls of Peripheral Pulmonary Arteries

An additional 5 animals from the N, H and DSCG + H groups were anesthetized with thiopental (40 mg/kg b.w. i.p.) after 4 days of hypoxia and euthanized by exsanguination from the abdominal aorta. Their lungs were removed from the chest, the 3rd and 4th branches of the pulmonary artery were dissected, digested by pepsin, and the supernatant with collagenous proteins was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. The 4-day period of hypoxia was selected because we knew from our previous studies that collagen cleavage is most abundant at the early phase of the hypoxic exposure [2].

Statistics

Statistical analyses were performed using ANOVA with Fischer's post-hoc test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The results are presented as means \pm SE.

Results

Rats exposed to hypoxia had significantly lower body weight than controls (table 1), although before the exposure, their body weight did not differ.

PAP was elevated in all groups exposed to 3 weeks of hypoxia; however, in the group of rats treated with DSCG during the first 4 days of hypoxia, the increase was significantly lower ($p < 0.05$) than in the other 2 groups exposed to hypoxia (fig. 1). Neither hypoxia nor administration of DSCG affected systemic arterial blood pressure. Cardiac output was significantly lower in all hypoxia-exposed groups than in controls ($p < 0.0001$). No differences in cardiac output were seen between the hypoxic groups (table 1).

Early application of DSCG partly prevented the thickening of the walls of peripheral pulmonary arteries in chronic hypoxia. The percentage of double-laminated peripheral pulmonary vessels was significantly lower ($p < 0.001$) in the DSCG + H group than in the H and H + DSCG groups (fig. 2). The RV/LV + S ratio was significantly lower in both DSCG-treated groups compared with the nontreated group H ($p < 0.05$) (table 1). The values of the heart weight (RV + LV + S) did not differ between the groups (N = 999 ± 20 , H = $1,056 \pm 36$, DSCG + H = $1,035 \pm 44$ and H + DSCG = 976 ± 36 mg). The weights of the RV were significantly higher ($p < 0.001$) in all groups exposed to hypoxia than in normoxic controls (N = 196 ± 5 , H = 372 ± 24 , DSCG + H = 329 ± 25 and H + DSCG = 309 ± 18 mg). The weights of the

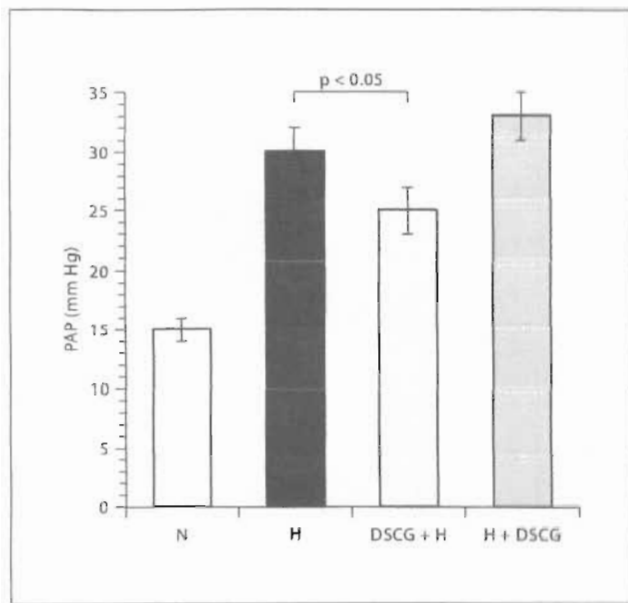


Fig. 1. DSCG treatment during the first 4 days of chronic hypoxia reduces PAP at the end of 3-week exposure. All groups exposed to hypoxia were significantly different ($p < 0.0001$) from the N group. $p < 0.05$ between the H group and the DSCG + H group.

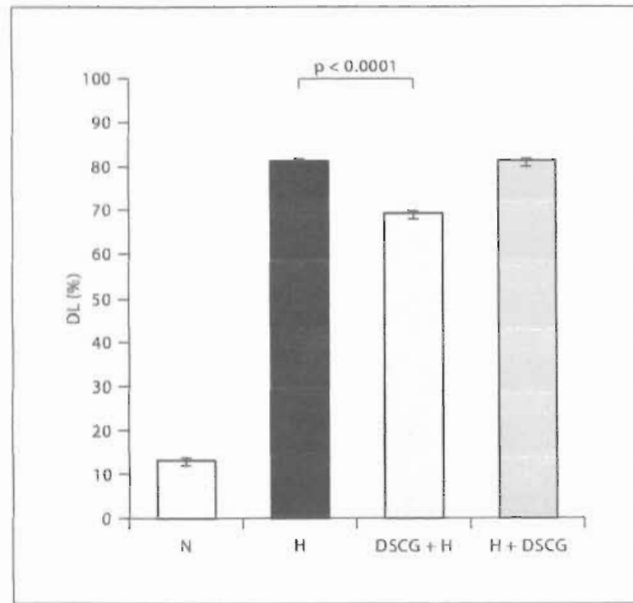


Fig. 2. DSCG treatment during the first 4 days of chronic hypoxia decreases the percentage of double-laminated peripheral pulmonary vessels (DL). All groups exposed to hypoxia were significantly different ($p < 0.0001$) from the N group. $p < 0.0001$ between the DSCG + H and the H group.

Table 1. Hemodynamic parameters

Group	n	Body weight, g	CO, ml/min	SAP, mm Hg	RV/LV + S, mg/g
N	8	425 ± 8	61 ± 3	114 ± 4 ^a	0.245 ± 0.006
H	8	337 ± 5**	37 ± 3**, ^a	112 ± 4	0.541 ± 0.033**
DSCG + H (early)	8	329 ± 2**	38 ± 3**, ^b	111 ± 5	0.467 ± 0.028*, **
H + DSCG (late)	8	349 ± 7**	35 ± 2**	118 ± 4	0.470 ± 0.020*, **

The data are means ± SE. CO = Cardiac output; SAP = systemic arterial mean blood pressure.

* $p < 0.05$, early and late DSCG-treated groups versus the H group.

** $p < 0.001$, hypoxic groups versus the N group.

^a Data from 7 animals; ^b data from 6 animals.

LV + S did not differ in groups exposed to hypoxia and they were lower ($p < 0.01$) than in normoxic rats (N = 802 ± 17, H = 685 ± 16, DCSG + H = 705 ± 25 and H + DSCG = 667 ± 31 mg).

Analysis of collagenous extracts from the walls of pulmonary arteries isolated from DSCG-treated and non-treated rats exposed for 4 days to hypoxia showed presence of the characteristic 3/4 and 1/4 fragments $\alpha 1$ and

$\alpha 2$ chains of collagen type I in all groups. These fragments were present in the normoxic group in minute amounts, while the hypoxic groups showed substantial quantities (fig. 3a). Densitometric analysis of the fragments confirmed a significantly lower density of fragments in extracts from the group treated with DSCG compared with other animals exposed to hypoxia (fig. 3b).

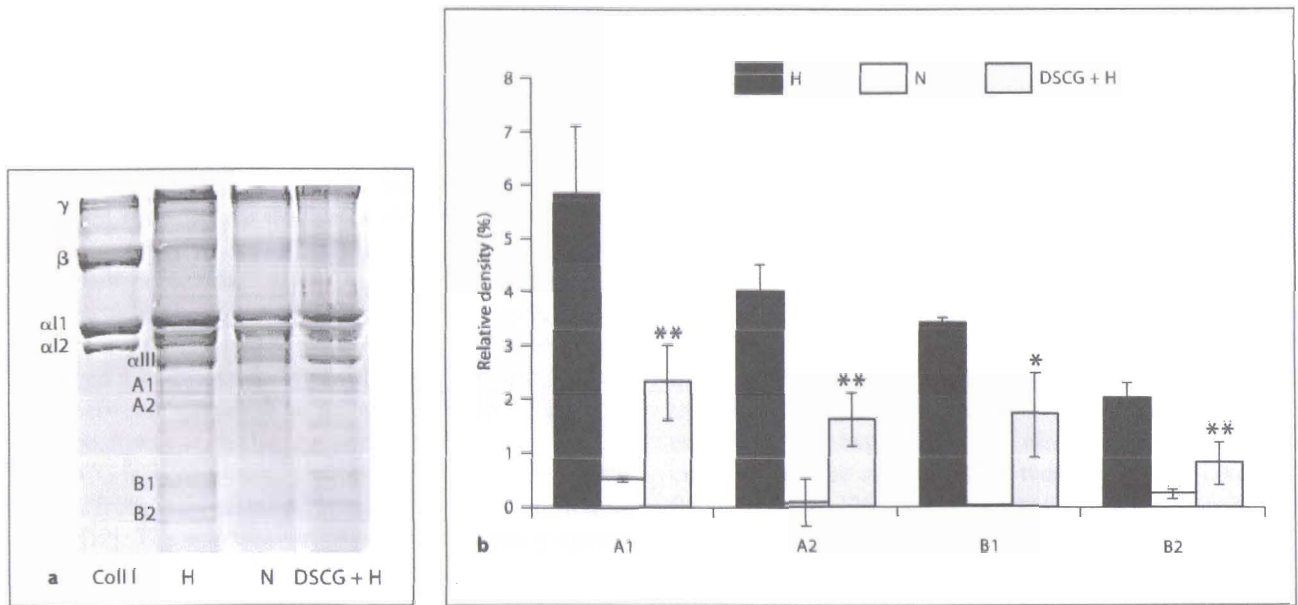


Fig. 3. **a** Gel electrophoresis profile of collagenous extracts from peripheral pulmonary arteries shows less collagen fragments in the DSCG + H group. Coll I = Standard of collagen type I from rat tail. **b** Relative densities of collagen fragments in extracts from peripheral pulmonary arteries. A1 and B1 (3/4 and 1/4 fragments) of $\alpha 1$ chain, A2 and B2 (3/4 and 1/4 fragments) of $\alpha 2$ chain in the groups H, N and DSCG + H. * $p < 0.02$ and ** $p < 0.01$, DSCG + H group versus H group.

Discussion

The main finding of our study is that prevention of mast cell degranulation by DSCG during the first 4 days of exposure to chronic hypoxia significantly attenuates the development of HPH and inhibits the presence of collagen cleavages in the walls of peripheral pulmonary arteries. Although mast cells produce various mediators, we suppose that the effect of DSCG is at least partly due to prevention of MMP release because the pharmacological inhibition of hypoxia-induced collagenolysis attenuates the development of HPH [4].

The fact that only early administration of DSCG had an inhibitory effect on pulmonary arterial hypertension gives support to the theory that the first days of hypoxic exposure play a crucial role in the pathogenesis of chronic HPH. In the rat, the HPH develops during the first 1–2 weeks of hypoxic exposure. Then HPH levels off into a steady state and does not progress any further. The first week of hypoxic exposure is characterized by radical damage of the lung tissue [11], and the lung mast cells accumulate in the vicinity of prealveolar pulmonary arteries particularly in the first week of exposure. In the steady

state, after 3 weeks of exposure, most mast cells were found near the conduit portion of the pulmonary vasculature [5]. We hypothesize that remodeling of prealveolar pulmonary arteries starts with an increased activity of the interstitial collagenase MMP-13 (rodent-like interstitial collagenase), which cleaves native collagen into 3/4 and 1/4 fragments. These fragments are typically present in peripheral pulmonary arteries of hypoxic animals [12] and, as reported by Gardi et al. [13], they can stimulate lung collagen metabolism. We show that the amount of these collagen fragments is reduced by inhibition of mast cell degranulation.

Mast cells degranulate in alveolar hypoxia [14]. Other authors [15] inhibited mast cell degranulation in rats with DSCG given during the whole period of exposure to hypoxia and found less right heart hypertrophy than in nontreated hypoxic rats, similarly to our study with DSCG treatment for only part of the exposure. The positive results in that study were the reason why we selected DSCG from the battery of drugs known to inhibit mast cell degranulation. In contrast, Mungall [16] did not demonstrate a protective effect of DSCG on the right ventricular hypertrophy in rats exposed to hypoxia. However,

the used dose of DSCG was 4 times lower than in our experiment (10 mg/kg b.w. i.p.). Zhu et al. [17] did not observe differences in PAP, right ventricular hypertrophy and peripheral pulmonary vessel muscularization between intact and mast cell-deficient mice exposed to chronic hypoxia. In contrast to the observations from our group [5], they did not find any effect of chronic hypoxia on the number or appearance of mast cells in control (mast cell possessing) mice. As a possible explanation, they argue by the relative infrequency of mast cells in the normal mouse compared with the rat. Tucker et al. [18] observed a wide variability in the number of lung mast cells between species. The number of mast cells correlated positively with the severity of HPH.

DSCG is a compound that inhibits the release of mediators from mast cells and acts as an anti-inflammatory agent [19]. The mechanism of action is not fully understood, but it is probably mediated by the phosphorylation of a 78-kDa mast cell protein, which leads to positional rearrangements of the membrane cytoskeleton and approaches plasma and secretory granule membranes [20]. By this mechanism, DSCG could inhibit the release of all mediators including chymotrypsin-like proteases, growth factors and chemotactic factors. Steiner et al. [21] demonstrated that blockade of mast cell degranulation significantly inhibited the microvascular response to systemic hypoxia (e.g., hypoxia-induced increase in reactive oxygen species, adherence and migration of leukocytes and vascular permeability). All these mechanisms participate in the pathogenesis of HPH [22].

Repeated lung inflammations with episodes of lung hypoxia are an important cause of HPH in patients [23–25]. Inhibitors of mast cell degranulation may mitigate the development of HPH in these patients.

As expected, the RV/LV + S weight ratio increased in our H group (rats exposed to chronic hypoxia only), and this increase was attenuated in our group treated with

DSCG at the early stage of the hypoxic exposure along with the inhibition of the increase in PAP. Surprisingly, the ratio was similar in both DSCG-treated groups, i.e. administration of DSCG for the last 4 days of hypoxia affected the RV/LV + S weight ratio although it had no effect on PAP. This finding could be explained by different effects of hypoxia on mast cell density in the heart and peripheral pulmonary vessels. An increase in the mast cell density in the vicinity of prealveolar pulmonary blood vessels is restricted only to the early phase of hypoxic exposure. After 3 weeks of hypoxia, the number of mast cells in that location does not differ from that found in normoxia [5]. This explains why DSCG applied at the end of hypoxic exposure has no effect on pulmonary vascular resistance and vascular remodeling. In contrast, Rakusan et al. [26] reported a persistent increase in the number of mast cells in hearts of rats acclimatized to high altitude for 4 weeks. The interesting finding of their study is that a similar increase in the heart mast cell density was not found in rats with renal hypertension. It suggests that the increase in heart mast cell density is not a simple function of ventricular pressure load.

We conclude that administration of DSCG at an early stage of hypoxia reduced the development of HPH while it is without effect if administered at a later stage of hypoxic exposure. Mast cell degranulation appears to be an important factor in the initial phase of pulmonary vascular remodeling.

Acknowledgements

We thank Eric Johnson, B.C. Pharm., for the language revision of the manuscript.

The study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic 305/05/0672, the Grant Agency of Charles University 7228/2007 and by the Cardiovascular Research Centre MSMT 1M0510.

References

- 1 Novotná J, Herget J: Possible role of matrix metalloproteinases in reconstruction of peripheral pulmonary arteries induced by hypoxia. *Physiol Res* 2002;51:323–334.
- 2 Novotná J, Herget J: Exposure to chronic hypoxia induces qualitative changes of collagen in the walls of peripheral pulmonary arteries. *Life Sci* 1998;62:1–12.
- 3 Herget J, Wilhelm J, Novotná J, Eckhardt A, Vytásek R, Mrázková L, Ošťádal M: A possible role of oxidant tissue injury in the development of pulmonary hypertension. *Phys Res* 2000;49:493–501.
- 4 Herget J, Novotná J, Bíbová J, Povýšilová V, Vaňková M, Hampl V: Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L199–L208.
- 5 Vajner L, Vytásek R, Lachmanova V, Uhlik J, Konradova V, Novotna J, Hampl V, Herget J: Acute and chronic hypoxia as well as 7-day recovery from chronic hypoxia affects the distribution of pulmonary mast cells and their MMP-13 expression in rats. *Int J Exp Pathol* 2006;87:383–391.
- 6 Maxová H, Novotná J, Vajner L, Vizek M, Vytásek R, Herget J: Hypoxia increases synthesis of metalloproteinases in isolated rat lung mast cells. *Phys Res* 2002;51:69P.

- 7 Hampl V, Herget J: Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:619-624.
- 8 Herget J, Paleček F: Pulmonary arterial blood pressure in closed chest rats. Changes after catecholamines, histamine and serotonin. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1972; 198:107-117.
- 9 Hampl V, Archer SL, Nelson DP, Weir EK: Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 1993;75:1748-1757.
- 10 Herget J, Suggett AJ, Leach E, Barer GR: Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax* 1978;33:468-473.
- 11 Wilhelm J, Vankova M, Maxova H, Siskova A: Hydrogen peroxide production by alveolar macrophages is increased and its concentration is elevated in the breath of rats exposed to hypoxia: relationship to lung lipid peroxidation. *Physiol Res* 2003;52:327-332.
- 12 Novotná J, Bibová J, Hampl V, Deyl Z, Herget J: Hyperoxia and recovery from hypoxia alter collagen in peripheral pulmonary arteries similarly. *Physiol Res* 2001;50:153-163.
- 13 Gardi C, Martorana PA, Calzoni P, Cavara E, Marcolongo P, de Santi MM, van Even P, Lungarella G: Cardiac collagen changes during the development of right ventricular hypertrophy in tight-skin mice with emphysema. *Exp Mol Pathol* 1994;60:100-107.
- 14 Nadziejko CE, Loud AV, Kikkawa Y: Effect of alveolar hypoxia on pulmonary mast cells in vivo. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:743-748.
- 15 Kay JM, Suyama KL, Keane PM: Mast cell stabilizing compound FPL 55618 reduces right ventricular hypertrophy and lung mast cell hyperplasia in chronically hypoxic rats. *Experientia* 1981;37:75-76.
- 16 Mungall IPF: Hypoxia and lung mast cells: influence of disodium cromoglycate. *Thorax* 1976;31:94-100.
- 17 Zhu YJ, Kradin R, Brandstetter RD, Staton G, Moss J, Hales CA: Hypoxic pulmonary hypertension in the mast cell-deficient mouse. *J Appl Physiol* 1983;54:680-686.
- 18 Tucker A, McMurtry I, Alexander AF, Reeves JT, Grover RF: Lung mast cell density and distribution in chronically hypoxic animals. *J Appl Physiol* 1977;42:174-178.
- 19 Matsuo N, Shimoda T, Matsuse H, Obase Y, Asai S, Kohno S: Effects of sodium cromoglycate on cytokine production following antigen stimulation of a passively sensitized human lung model. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84:72-78.
- 20 Theoharides TC, Wang L, Pang X, Letourneau R, Culm KE, Basu S, Wang Y, Correia I: Cloning and cellular localization of the rat mast cell 78-kDa protein phosphorylated in response to the mast cell 'stabilizer' cromolyn. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294:810-821.
- 21 Steiner DR, Gonzalez NC, Wood JG: Mast cells mediate the microvascular inflammatory response to systemic hypoxia. *J Appl Physiol* 2003;94:325-334.
- 22 Hampl V, Herget J: Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* 2000;80:1337-1384.
- 23 Filley GF, Beckwith HJ, Reeves JT, Mitchell RS: Chronic obstructive bronchopulmonary disease. 2. Oxygen transport in two clinical types. *Am J Med* 1968;44:26-38.
- 24 Turato G, Zuin R, Saetta M: Pathogenesis and pathology of COPD. *Respiration* 2001; 68:117-128.
- 25 van Eeden SF, Sin DD: Chronic obstructive pulmonary disease: a chronic systemic inflammatory disease. *Respiration* 2007, Epub ahead of print.
- 26 Rakusan K, Sarkar K, Turek Z, Wicker P: Mast cells in the rat heart during normal growth and in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 1990;66:511-516.